



GABRIELA CORASSA RODRIGUES DA CUNHA

**Sequenciamento de exoma em pacientes com suspeita clínica de Síndrome de  
Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser**

BRASÍLIA

2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIELA CORASSA RODRIGUES DA CUNHA

**Sequenciamento de exoma em pacientes com suspeita clínica de Síndrome de  
Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Coorientadora: Dra. Aline Pic-Taylor

BRASÍLIA

2024

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ser minha força em todos os momentos da minha vida. Durante esse longo e desafiador processo de doutorado, enfrentei dias de incerteza e cansaço, mas Sua presença constante me deu a coragem necessária para superar cada obstáculo.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Juliana Mazzeu, pela orientação e suporte. Obrigada pelos valiosos ensinamentos durante essa jornada.

À minha coorientadora, Dr<sup>a</sup> Aline Pic, por sua disponibilidade e pelas contribuições fundamentais ao meu desenvolvimento acadêmico.

Ao corpo Médico do Ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília, por todo cuidado na avaliação das pacientes e pelas discussões enriquecedoras que contribuíram para o resultado deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Genética, agradeço o apoio.

Ao Dr. Napoleão, registro meu agradecimento pelo auxílio e pelos ensinamentos na realização da modelagem molecular. Sua contribuição foi essencial para a condução desta análise.

Aos meus amados pais, Lucas Rodrigues e Fernanda Corassa, sou eternamente grata por todo amor, sacrifício e dedicação ao longo da minha vida. Vocês são meus exemplos de luta, comprometimento e companheirismo. Agradeço por acreditarem que os estudos têm o poder de transformar vidas. Amo vocês.

Ao meu querido esposo, Fernando Fellows, por todo apoio e incentivo, não apenas durante a elaboração deste trabalho, mas ao longo de toda nossa vida juntos. Seu suporte emocional e sua fé em mim foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Eu amo você.

À minha amiga, Vanessa Sodré, sou grata pela parceria e pelos momentos de apoio mútuo. Sua amizade tornou essa caminhada mais leve.

  Universidade de Brasília e a todas as universidades públicas, expresso meu reconhecimento pela importância que desempenham na forma o educacional da popula o e na produ o de conhecimento científico.

  FAP-DF, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) é caracterizada por agenesia/hipoplasia do útero e do terço superior do canal vaginal. Mulheres afetadas possuem desenvolvimento das características sexuais secundárias e cariótipo normal para o sexo feminino. Embora sua etiologia seja ainda desconhecida, a hipótese de que tenha componentes genéticos envolvidos é sustentada pela presença de agregação familiar. O presente trabalho teve por objetivo investigar alterações genéticas associadas à etiologia da MRKH utilizando o sequenciamento de exoma. Foram selecionadas 18 mulheres com suspeita clínica de MRKH atendidas no Ambulatório de Genética Médica do Hospital Universitário de Brasília. Entre as pacientes avaliadas, 12 receberam confirmação diagnóstica de MRKH, duas foram diagnosticadas com condições que fazem parte do diagnóstico diferencial e quatro não apresentavam os critérios necessários para o diagnóstico de MRKH. O sequenciamento de exoma foi realizado em todas as pacientes e permitiu a conclusão do diagnóstico em dois casos, sendo uma com Síndrome CHARGE e outra com Síndrome da Insensibilidade Androgênica. Em seis pacientes não foram identificadas alterações genéticas relevantes. Em quatro mulheres não relacionadas com MRKH foi identificada uma mesma variante em heterozigose no gene *WT1*. Além disso, foram identificadas duas variantes patogênicas: uma no gene *CHD7* e uma duplicação 7q11.23. Também foram identificadas quatro variantes possivelmente patogênicas nos genes *SPEN*, *KYNU*, *AR* e *HOXA1*; cinco variantes de significado incerto, incluindo alterações nos genes *ESR1*, *RET*, *WNT4*, *MAMLD1*, e uma deleção 6q14.3; e uma variante possivelmente benigna no gene *GLI3*. A busca e identificação de alterações genéticas que contribuem para o desenvolvimento da síndrome poderá auxiliar na compreensão de sua etiologia, melhoria do diagnóstico, manejo e aconselhamento. Em adição poderá colaborar para o conhecimento acerca do desenvolvimento do trato reprodutor feminino.

**Palavras-chave:** Síndrome de Rokitansky. Malformação mülleriana. MRKH. CMA. Exoma.

## ABSTRACT

The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome (MRKH) is characterized by agenesis/hypoplasia of the uterus and the upper third of the vagina. Affected women exhibit the development of secondary sexual characteristics and have a normal female karyotype. Although its etiology remains unknown, the hypothesis that genetic components are involved is supported by the presence of familial aggregation. The present study aimed to investigate genetic alterations associated with the etiology of MRKH using exome sequencing. A total of 18 women with a clinical suspicion of MRKH, who were treated at the Medical Genetics Outpatient Clinic of the University Hospital of Brasília, were selected. Among the patients evaluated, 12 received a confirmed diagnosis of MRKH, two were diagnosed with conditions that are part of the differential diagnosis, and four did not meet the necessary criteria for diagnosing MRKH. Exome sequencing was performed on all patients and allowed the conclusion of the diagnosis in two cases, one being diagnosed with CHARGE Syndrome and the other with Androgen Insensitivity Syndrome. In six patients, no relevant genetic alterations were identified. In four unrelated MRKH women, the same heterozygous variant was identified in the *WT1* gene. Additionally, two pathogenic variants were found: one in the *CHD7* gene and a 7q11.23 duplication. Four likely pathogenic variants were also identified in the *SPEN*, *KYNU*, *AR*, and *HOXA1* genes; five variants of uncertain significance, including alterations in the *ESR1*, *RET*, *WNT4*, and *MAMLD1* genes, as well as a 6q14.3 deletion; and one likely benign variant in *GLI3* gene. The search and identification of genetic alterations that contribute to the development of the syndrome may aid in understanding its etiology, improving diagnosis, management, and counseling. Furthermore, it may contribute to knowledge regarding the development of the female reproductive tract.

**Keywords:** Rokitansky Syndrome, Müllerian malformation, MRKH, CMA, Exome.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Dilatadores utilizados para formação de neovagina -----	18
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do sistema reprodutor feminino normal e em mulheres com MRKH -----	19
<b>Figura 3.</b> Gônada bipotencial no estágio inicial de desenvolvimento embrionário ---	27
<b>Figura 4.</b> Classificação DDS -----	29
<b>Figura 5.</b> Representação da estrutura do gene <i>AR</i> -----	31
<b>Figura 6.</b> Desenvolvimento dos ductos de Müller-----	33
<b>Figura 7.</b> Desenvolvimento do canal vaginal -----	34
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo do septo vaginal transverso e do hímen imperfurado -----	35
<b>Figura 9.</b> Fluxograma do estudo -----	38
<b>Figura 10.</b> Protocolo plataforma <i>Affymetrix Cytoscan 750k Array</i> -----	42
<b>Figura 11.</b> Etapas do sequenciamento de exoma -----	44
<b>Figura 12.</b> Estratégias de filtragem utilizadas para análise de variantes -----	46
<b>Figura 13.</b> Estrutura das sondas utilizadas no MLPA -----	48
<b>Figura 14.</b> Etapa de ligação do protocolo de MLPA-----	49
<b>Figura 15.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>WT1</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	62
<b>Figura 16.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>SPEN</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	65
<b>Figura 17.</b> Sequenciamento Sanger do gene <i>SPEN</i> -----	65
<b>Figura 18.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>KYNU</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	68
<b>Figura 19.</b> Sequenciamento Sanger do gene <i>KYNU</i> -----	68
<b>Figura 20.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>RET</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	71
<b>Figura 21.</b> Estrutura do receptor RET e seus ligantes -----	72
<b>Figura 22.</b> Mecanismo de ativação do receptor RET -----	73
<b>Figura 23.</b> Desenvolvimento do Broto Uretérico -----	74
<b>Figura 24.</b> Representação da proteína RET-AMP-----	76

<b>Figura 25.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>WNT4</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	78
<b>Figura 26.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>HOXA1</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	83
<b>Figura 27.</b> Organização dos genes <i>HOX</i> -----	84
<b>Figura 28.</b> Genes <i>HOX</i> no desenvolvimento das estruturas derivadas dos ductos de Müller-----	85
<b>Figura 29.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>AR</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	91
<b>Figura 30.</b> Estrutura cristalográfica do complexo formado pelo AR e o ligante dihidrotestostona (PDB 1T7R)-----	93
<b>Figura 31.</b> Rede de ligações de hidrogênio no receptor AR-----	94
<b>Figura 32.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>ESR1</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	97
<b>Figura 33.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>BRCA2</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	100
<b>Figura 34.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>CHD7</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	104
<b>Figura 35.</b> Comparação dos critérios para diagnóstico de CHARGE -----	106
<b>Figura 36.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>GLI3</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	109
<b>Figura 37.</b> Esquemas ilustrativos demonstrando a divisão da cloaca -----	111
<b>Figura 38.</b> Estrutura da proteína GLI3 -----	112
<b>Figura 39.</b> Visualização da variante identificada no gene <i>MAMLD1</i> no <i>Integrative Genomics Viewer (IGV)</i> -----	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Genes do painel MRKH.....	46
<b>Tabela 2</b> - Sequência dos <i>primers</i> utilizados para sequenciamento.....	50
<b>Tabela 3</b> - Reagentes utilizados para amplificação por PCR.....	50
<b>Tabela 4</b> - Condições da PCR utilizando o <i>primer KYNU</i> .....	51
<b>Tabela 5</b> - Condições da PCR utilizando o <i>primer SPEN</i> .....	51
<b>Tabela 6</b> - Resumo das características clínicas e resultados do cariótipo, PCR e CMA das participantes do estudo.....	58
<b>Tabela 7</b> - Variantes identificadas por sequenciamento de exoma. ....	60

## LISTA DE BREVIATURA

AbraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
ADAMTS	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs</i>
ADM	Anomalia do Ducto Mülleriano
AIS	Síndrome da Insensibilidade Androgênica
AMH	Hormônio Anti-Mulleriano
AMP	Adenosina Monofosfato
AR	Receptor Androgênico
ARBD	<i>The Androgen Receptor Gene Mutations Database</i>
ARE	Elementos de Resposta Androgênica
ARTN	Artemina
ATP	Adenosina Trifosfato

AVF	Anteversoflexão
CAIS	Síndrome da Insensibilidade Androgênica Completa
CAKUT	Anomalias Congênitas do Rim e Trato Urinário
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
ChAS	<i>Chromosome Analysis Suite</i>
ClinVar	<i>Clinical Variant Database</i>
CMA	Análise Cromossômica por <i>Microarray</i>
CNV	Varição no Número de Cópias
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
dbSNP	The Single <i>Nucleotide Polymorphism Database</i>
DDS	Distúrbio de Diferenciação Sexual
DNMT	DNA Metiltransferase
EDTA	Ácido Etileno Diamina Tetracético
ER $\alpha$	Receptor Estrogênico $\alpha$
ER $\beta$	Receptor Estrogênico $\beta$
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDNF	<i>Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor</i>
GFL	Ligantes da Família GDNF
GFR $\alpha$	<i>GDNF-family Receptor-<math>\alpha</math></i>
GH	Hormônio de Crescimento
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
HH	Hipogonadismo Hipogonadotrófico
HUB	Hospital Universitário de Brasília

ICR1	Região de Controle de <i>Imprinting</i> 1
LBD	Domínio de Ligação ao Andrógeno
LCR	<i>Low Copy Repeat</i>
LH	Hormônio Luteinizante
MA	Aplasia Mülleriana
MAIS	Síndrome da Insensibilidade Androgênica Moderada
MLPA	<i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i>
MRKH	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser
MURCS	Aplasia do Ducto de Müller, Displasia Renal e Anomalias Cérvico-Torácicas
NAD+	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
ncRNA	RNA não codificante
NRTN	Neurturina
NTD	Domínio N-terminal
OD	Ovário Direito
OE	Ovário Esquerdo
OGM	Mapeamento Óptico Genômico
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PAIS	Síndrome da Insensibilidade Androgênica Parcial
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHS	Síndrome de Pallister-Hall
PSPN	Perfesina
RD	Rim Direito
RE	Rim Esquerdo
RM	Ressonância Magnética

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRM	Motivo de Reconhecimento ao RNA
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SRS	Síndrome de Silver Russell
SRT	Síndrome de Rubinstein-Taybi
SV	Variante Estrutural
SVT	Septo Vaginal Transverso
SWB	Síndrome de Williams-Beuren
TA	Domínio de Transativação
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
USG	Ultrassonografia
VCRL	<i>Vertebral, Cardiac, Renal and Limb Defect Syndrome</i>
VUS	Variante de Significado Incerto
<i>XIST</i>	<i>X Inactive Specific Transcript</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	SÍNDROME DE MAYER-ROKITANSKY-KÜSTER-HAUSER	15
3	ETIOLOGIA	20
4	ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS	24
5	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	26
5.1	SÍNDROME DA INSENSIBILIDADE ANDROGÊNICA (AIS)	26
5.2	SEPTO VAGINAL TRANSVERSO E HÍMEN IMPERFURADO	32
6	JUSTIFICATIVA	36
7	OBJETIVO	36
7.1	OBJETIVO GERAL	36
7.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
8	METODOLOGIA	37
8.1	SELEÇÃO DE PACIENTES	38
8.2	MATERIAL BIOLÓGICO	39
8.3	EXAME DE CARIÓTIPO	39
8.4	EXTRAÇÃO DE DNA	40
8.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	40
8.6	ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY (CMA)	41
8.7	SEQUENCIAMENTO DE EXOMA	42
8.7.1	Análise do exoma	44
8.8	MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION (MLPA)	47
8.9	SEQUENCIAMENTO SANGER	49
8.10	MODELAGEM MOLECULAR	52
9	RESULTADOS	52
9.1	DESCRIÇÃO DAS NOVAS PACIENTES INCLUÍDAS NESTE TRABALHO	54
9.2	SÍNTESE DOS RESULTADOS	57
10	DISCUSSÃO	61
10.1	VARIANTES IDENTIFICADAS EM PACIENTES MRKH	61
10.1.1	<i>WT1</i> :c.-8_-7delGC (NM_001198551.1)	61
10.1.2	<i>SPEN</i> :c.9758_9759delCT (NM_015001.3)	64
10.1.3	<i>KYNU</i> :c.447dupT (NM_003937.3)	67
10.1.4	<i>RET</i> :c.2188C>G (NM_020975.6)	70
10.1.5	Del 6q14.3	76
10.1.6	<i>WNT4</i> :c.-45delC (NM_030761.5)	77
10.1.7	Dup 7q11.23	80
10.1.8	<i>HOXA1</i> :c.393C>A (NM_005522.4)	82

<b>10.2</b>	<b>PACIENTES MRKH SEM VARIANTE RELEVANTE IDENTIFICADA</b>	<b>86</b>
<b>10.3</b>	<b>PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL COM MRKH</b>	<b>89</b>
10.3.1	Síndrome da Insensibilidade Androgênica	89
10.3.2	Septo Vaginal Transverso	95
<b>10.4</b>	<b>PACIENTES NÃO CLASSIFICADAS COMO MRKH</b>	<b>97</b>
10.4.1	Sem Diagnóstico Definido	97
10.4.2	Síndrome CHARGE	103
10.4.3	Anomalia Mülleriana diferente da MRKH	108
<b>10.5</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	<b>116</b>
<b>11</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>119</b>
<b>12</b>	<b>APÊNDICE</b>	<b>120</b>
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	120
<b>13</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>122</b>
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNB	122
<b>14.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>126</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Anomalias no sistema reprodutor feminino se originam durante o período embrionário em decorrência do desenvolvimento comprometido dos ductos paramesonéfricos ou ductos de Müller. Essas alterações no desenvolvimento levam a um amplo espectro de malformações que, dependendo do nível de comprometimento, podem afetar a saúde e a vida reprodutiva, variando desde fenótipos amenos, geralmente assintomáticos, até fenótipos complexos (GRIMBIZIS; CAMPO, 2010; PASSOS; BRITTO, 2020).

Acometendo cerca de 7% das mulheres, as anomalias do sistema reprodutor feminino são também chamadas de anomalias dos ductos müllerianos (ADM) e constituem um grupo de alterações que podem atingir desde o hímen até o útero, resultando em malformações consideradas obstrutivas e não obstrutivas. As ADM podem se apresentar de maneira isolada ou associada a alterações em outros sistemas que possuem proximidade embriológica (DIETRICH; MILLAR; QUINT, 2014a; WU et al., 2021). Em adição, frequentemente compõem o quadro de síndromes genéticas, distúrbios de diferenciação sexual (DDS), malformação anorretal e malformação de cloaca (DIETRICH, 2015).

Os ductos de Müller são os primórdios do sistema reprodutor feminino e estão presentes bilateralmente na gônada indiferenciada. Após a fusão da sua porção caudal, o septo existente entre os dois ductos é reabsorvido, dando origem ao útero e porção superior do canal vaginal, enquanto as tubas uterinas são originadas a partir da porção onde não ocorreu fusão. O desenvolvimento anormal desses ductos pode gerar um amplo espectro de malformações que estão diretamente relacionadas ao momento do desenvolvimento que foi interrompido (LEDIG; WIEACKER, 2018; PITOT; BOOKWALTER; DUDIACK, 2020).

Tendo em vista que o comprometimento pode estar presente tanto na fase de formação quanto na fase de fusão e reabsorção dos ductos de Müller, quanto mais cedo ocorre a interrupção, mais grave tende a ser a anomalia observada. Esse amplo espectro de apresentação fenotípica dá origem a uma diversidade de diagnósticos assim como uma ampla gama de tratamentos. Uma forma severa de alteração mülleriana se caracteriza por agenesia/hipoplasia uterovaginal, conhecida como

Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH; OMIM %277000) (PASSOS; BRITTO, 2020).

Tanto a MRKH quanto outras alterações obstrutivas são exemplos de anomalias do sistema reprodutor feminino que se apresentam com amenorreia primária, contudo outras condições como Síndrome da Insensibilidade Androgênica (AIS) e disgenesia gonadal mista também podem se apresentar de maneira semelhante (DIETRICH; MILLAR; QUINT, 2014b; KAPCZUK; KĘDZIA, 2021).

## **2 SÍNDROME DE MAYER-ROKITANSKY-KÜSTER-HAUSER**

A MRKH é uma desordem congênita, de mecanismo patogênico pouco compreendido, caracterizada por agenesia uterina e dos dois terços superiores do canal vaginal (WATANABE et al., 2017). Também conhecida por Aplasia Mülleriana (MA), a MRKH possui incidência estimada de 1:5000 nascidas vivas. As mulheres acometidas por essa condição possuem os caracteres sexuais secundários desenvolvidos e cariótipo normal para o sexo feminino, 46, XX (HERLIN et al., 2019).

Os relatos de ausência congênita de canal vaginal e útero tem sua primeira ocorrência no século XVI. Em 1559, ela foi relatada pela primeira vez por Realdus Columbus, entretanto com uma descrição vaga sobre o caso. Posteriormente, em 1572, ele utilizou o termo “vulva rara” para se referir à agenesia uterovaginal. Em 1829, o anatomista e fisiologista Karl Mayer, descreve um caso de encurtamento de vagina e útero rudimentar com presença de alterações cardíacas e renais, o que ele chamou de “uterus bipartitus”. Após nove anos, Carl Rokitansky, em 1838, publicou um artigo descrevendo ausência de desenvolvimento vaginal e útero hipoplásico (HERLIN; HØJLAND; PETERSEN, 2014; PATNAIK et al., 2015).

Anos se passaram até que, em 1910, Küster realizou o primeiro relato dessa condição em uma mulher viva. Somente em 1961, Hauser também associou defeitos esqueléticos às alterações urogenitais e a definiu como Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster, onde posteriormente o nome Hauser também foi incluído (OPPELT et al., 2006; SOUSA et al., 2014; SHY, 2016).

A manifestação clínica da MRKH é variável, podendo apresentar malformações que vão além da aplasia/agenesia uterina e dos dois terços superiores do canal

vaginal. Dessa maneira, a **MRKH típica** ou **tipo I** é caracterizada pelo comprometimento limitado ao sistema reprodutor, sendo afetada somente a porção superior da vagina, cérvix e útero (FONTANA et al., 2017). Em adição, pacientes que possuem malformações extragenitais como alterações renais, esqueléticas, cardíacas e auditivas são classificadas como **MRKH atípica** ou **tipo II**. Por último, a **Associação de MURCS**, descrita pela primeira vez por Duncan et al. (1979) é considerada a forma mais severa da MRKH II, sendo caracterizada pela combinação de aplasia **Mülleriana** e **Renal** e displasia dos **Somitos Cérvico-Torácicos** (COUTO; MARQUES; ÁGUAS, 2007; AL DANDAN et al., 2019).

As alterações que atingem o sistema urinário como agenesia renal unilateral, rim pélvico, rim em ferradura, hipoplasia renal, hidronefrose e rins ectópicos constituem as malformações extragenitais mais frequentes e afetam aproximadamente 40% das pacientes (MORCEL; CAMBORIEUX; GUERRIER, 2007; HERLIN; PETERSEN; BRÄNNSTRÖM, 2020). Dentre as alterações esqueléticas, observadas em 20% dos casos, podemos citar fusão de vértebras, escoliose e anomalia de Klippel-Feil (GUERRIER et al., 2006).

O comprometimento auditivo está presente em cerca de 10-25% dos casos de MURCS, e é decorrente de malformação de ouvido médio ou defeitos neurossensoriais. Já as malformações cardíacas como por exemplo, janela aortopulmonar, defeito do septo atrial e estenose pulmonar valvar, assim como anomalias digitais, como sindactilia e polidactilia, são manifestações raramente encontradas nessas pacientes (FONTANA et al., 2017; HERLIN; PETERSEN; BRÄNNSTRÖM, 2020).

Geralmente, a busca por auxílio médico ocorre por queixa de amenorreia primária durante a adolescência. Na maioria das vezes, a ausência de menstruação é o primeiro sinal clínico apresentado e pode vir acompanhada de cólicas cíclicas nos casos em que tecido endometrial é encontrado nos remanescentes müllerianos. Contudo, outras queixas também são frequentes como a dispareunia e a esterilidade (CHOUSSEIN et al., 2017). Ao exame físico, as pacientes diagnosticadas com MRKH apresentam genitália externa feminina sem alterações, encurtamento do canal vaginal e caracteres sexuais secundários desenvolvidos já que a função ovariana normalmente se encontra inalterada (LAYMAN, 2014; PLUTA et al., 2020).

Quando a hipótese de diagnóstico de MRKH é levantada, deve ser realizado um conjunto de exames que permitem a identificação das alterações genitais e

extragenitais, caso existam. Entre estes exames estão o cariótipo, os exames de imagem e o perfil hormonal, como dosagem de FSH (hormônio folículo estimulante), LH (hormônio luteinizante) e estradiol, que são normais nessa síndrome. Essas ferramentas são importantes para o diagnóstico correto e exclusão de outras doenças que podem se apresentar de forma semelhante a MRKH (MORCEL; CAMBORIEUX; GUERRIER, 2007; ROUSSET et al., 2013).

O cariótipo é utilizado na análise investigativa como instrumento para confirmação do cariótipo feminino normal e para o diagnóstico diferencial entre a MRKH e a AIS. Essa condição possui grandes semelhanças com a MRKH, já que as pacientes portadoras de AIS apresentam amenorreia primária, desenvolvimento mamário normal, encurtamento do canal vaginal e ausência de cérvix. Contudo, elas também possuem diminuição ou ausência de pelos axilares e pubianos, presença de testículos e cariótipo 46, XY (ACOG, 2018).

Comumente a ultrassonografia (USG) pélvica é o exame de escolha para dar início à investigação por imagem em pacientes com alterações müllerianas (PIZZO et al., 2013). Esse exame auxilia na avaliação dos ovários e do útero e possui vantagens em relação a outros exames de imagem já que é um método não invasivo, simples e de baixo custo, porém, em alguns casos pode ser inconclusivo (FOLCH; PIGEM; KONJE, 2000; BOMBARD; MOUSA, 2014).

Além da USG, a ressonância magnética (RM) e a laparoscopia são outras duas metodologias frequentemente utilizadas na avaliação dessas pacientes. A RM é uma ferramenta importante para avaliação uterina e ovariana nessas mulheres sendo escolhida normalmente quando a USG é inconclusiva. Além disso, é considerada mais precisa e específica e permite a avaliação de outras malformações como as renais e ósseas (MORCEL et al., 2008; LERMANN et al., 2011; FIASCHETTI et al., 2012).

Por ser um método invasivo, a laparoscopia não é a primeira ferramenta escolhida para avaliação diagnóstica, sendo aconselhado submeter somente aquelas pacientes que irão passar por intervenção cirúrgica terapêutica (BOMBARD; MOUSA, 2014). Contudo, apesar de possuir maior custo que a RM, a laparoscopia pode ser indicada para avaliação daqueles casos em que a dor pélvica é relatada (BOMBARD; MOUSA, 2014).

Devido ao impacto psicológico que o diagnóstico de MRKH pode trazer para as mulheres, o acompanhamento por psicólogos se torna um aspecto importante no manejo dessas pacientes e deve ser iniciado antes do tratamento (LAUFER, 2002;

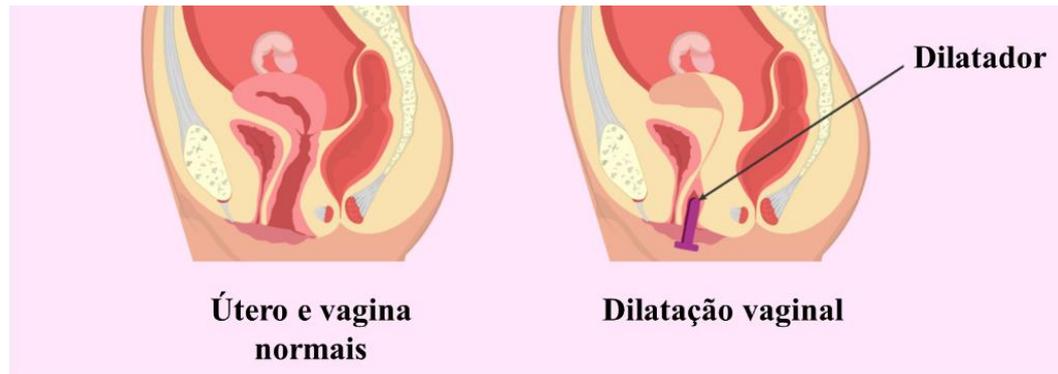
CALLENS et al., 2014). Além disso, mulheres afetadas pela síndrome possuem dificuldades em ter uma vida sexual ativa em decorrência da aplasia vaginal. Dessa maneira, a correção das alterações anatômicas compõe o tratamento e auxilia essas mulheres a se tornarem sexualmente ativas (NG et al., 2020).

Geralmente a criação de uma neovagina é adiada até que a paciente demonstre o interesse em dar início ao tratamento. Elas devem ser aconselhadas a somente começarem os procedimentos quando estiverem tanto emocionalmente quanto fisicamente prontas para a intervenção (ACOG, 2018).

A formação de neovagina pode ser realizada por procedimentos cirúrgicos ou não cirúrgicos, sendo este último um método não invasivo, considerado a primeira linha terapêutica. O método consiste na criação de neovagina por meio da utilização de dilatadores vaginais que crescem em comprimento e diâmetro em um processo de dilatação que foi descrito pela primeira vez por Frank em 1938 (**Figura 1**). Nessa técnica, o uso de dilatadores ao longo do tempo, resulta no processo de alongamento do tecido e formação de neovagina (**Figura 2**). Apesar da metodologia descrita por Frank não ser invasiva e possuir baixo custo, ela é dolorosa e, por isso, a paciente deve estar motivada a passar pelo processo para que se obtenha sucesso (NAKHAL; CREIGHTON, 2012).



**Figura 1.** Dilatadores utilizados para formação de neovagina. Fonte: amazon.com.br.



**Figura 2.** Representação esquemática do sistema reprodutor feminino normal e em mulheres com MRKH. Procedimento não invasivo com utilização de dilatador para formação de neovagina. Fonte: invitra.com.

Devido as desvantagens provenientes desse procedimento, como fadiga das mãos e a incapacidade de realizar outras atividades durante o processo de dilatação, Ingram em 1981, propôs uma modificação do método de Frank, onde a paciente usaria o peso corporal para criação da neovagina, utilizando os dilatadores em um assento de bicicleta (INGRAM, 1981).

Outra forma de criação de neovagina por procedimentos não cirúrgicos consiste na dilatação do canal vaginal por meio relações sexuais e deve ser indicada para aquelas pacientes que possuem parceiro fixo (EDMONDS, 2013). Em estudo conduzido por Moen (2014), a taxa de sucesso obtida por meio de relação sexual atingiu 95% das mulheres avaliadas e não foram reportadas complicações.

Diversas técnicas cirúrgicas já foram descritas na literatura para correção da alteração vaginal observada na MRKH. Existem técnicas baseadas em tração, como o procedimento de Vecchietti, onde a neovagina é formada a partir de uma combinação entre métodos cirúrgicos e não cirúrgicos, e as baseadas em enxerto como por exemplo a técnica de Abbe-McIndoe. No procedimento de McIndoe ocorre a dissecação do tecido e uso de enxerto para revestir a neovagina, formando o epitélio do canal. Essa é considerada uma das técnicas mais difundidas e é amplamente aplicada nos Estados Unidos. Apesar de ser um procedimento simples, algumas desvantagens já foram reportadas como o uso de dilatadores após a cirurgia para prevenção de estenose e dispareunia devido a lubrificação inadequada (NAKHAL; CREIGHTON, 2012; LONDRA; CHUONG; KOLP, 2015).

### 3 ETIOLOGIA

Devido a sua complexidade e heterogeneidade, pouco se sabe sobre a etiologia da MRKH. Casos familiares sugerem uma possível herança autossômica dominante com penetrância incompleta e expressividade variável. Por outro lado, a ocorrência de casos esporádicos, discordância de fenótipo em gêmeos monozigóticos e a não transmissão para a progênie naquelas mulheres que procuram a maternidade por útero de substituição, sugerem herança poligênica/multifatorial ou até mesmo etiologia não genética. Em adição, não se pode excluir a possibilidade de que fatores ambientais/epigenéticos também possam estar associados a etiologia dessa condição (FONTANA et al., 2017; HERLIN; PETERSEN; BRÄNNSTRÖM, 2020; KYEIBARFFOUR et al., 2021).

Na tentativa de compreender as alterações moleculares relacionadas a MRKH, diversos estudos realizaram investigações em genes candidatos. Genes com papel fundamental na embriogênese já foram previamente avaliados nesses estudos. Dentre estes genes estão: *WT1*, *PAX2*, *HOXA7* a *HOXA13* e *PBX1*, entre outros (MORCEL; CAMBORIEUX; GUERRIER, 2007).

Os estudos de genes envolvidos em patologias associadas a MRKH também foram avaliados anteriormente. A associação entre MRKH e galactosemia e fibrose cística levaram a investigação dos genes *GALT* e *CFTR* (CRAMER et al., 1996; TIMMRECK et al., 2003; FONTANA et al., 2017). Variantes em *CFTR* também estão associadas a ausência congênita de vasos deferentes e, segundo Timmreck et al., (2003), os mesmos genes poderiam estar envolvidos no desenvolvimento dos ductos de Müller e Wolff. Contudo, não foram identificadas variantes ou polimorfismos em *GALT* e *CFTR* que pudessem ter relação com a MRKH (KLIPSTEIN et al., 2003; TIMMRECK et al., 2003).

Variantes em outros genes como *AMH* e seu receptor (*AMHR*), que atuam na regressão dos ductos de Müller no sexo masculino e que poderiam comprometer o desenvolvimento normal do sexo feminino, foram avaliadas. Entretanto, não foi estabelecida associação com a síndrome (FONTANA et al., 2017; OPPELT et al., 2005)

Em 2004, Biason-Lauber e colaboradores descreveram uma paciente de 18 anos de idade com amenorreia primária, agenesia uterovaginal e hiperandrogenismo. Foi

identificada nessa paciente uma variante *missense* em heterozigose que leva a substituição de guanina por adenina no éxon 5 do gene *WNT4* gerando perda de função.

O gene *WNT4*, localizado em 1p36.12, possui papel importante no desenvolvimento embrionário. *WNT4* atua no processo de diferenciação ovariana, desenvolvimento dos ductos de Müller e repressão de testículos. A variante reportada pelos autores no gene *WNT4* foi a primeira a ser associada com a Síndrome, contudo, a agenesia mülleriana associada ao hiperandrogenismo foi considerada uma entidade separada da MRKH (BIASON-LAUBER et al., 2004; EGGERS; SINCLAIR, 2012; HERLIN et al., 2019).

A utilização da técnica de *microarray*, trouxe a possibilidade de fazer uma varredura no genoma permitindo a identificação de deleções ou duplicações sem a necessidade de um gene alvo. Dessa maneira, algumas regiões cromossômicas foram identificadas alteradas em pacientes com MRKH. Variações no número de cópias (CNVs) localizadas em 1q21.1, 16p11.2, 17q12, 22q11.21 e Xp22 foram reportadas como mais recorrentes na literatura (FONTANA et al., 2017; HERLIN; PETERSEN; BRÄNNSTRÖM, 2020).

Deleções localizadas em 22q11.21 são associadas a Síndrome de DiGeorge, caracterizada por defeitos cardíacos, dismorfia facial, além de alterações comportamentais e cognitivas (LEDIG; WIEACKER, 2018). Em contrapartida, a deleção 22q11.21 foi reportada em um feto com aplasia mülleriana, defeitos cardíacos e agenesia renal bilateral por Morcel e colaboradores (2011). Autores sugerem que a associação de MURCS pode ser uma variação dentro do amplo espectro da síndrome de DiGeorge.

A correlação entre deleção 22q11 e MRKH também foi reportada por Cherokee et al. (2006). A deleção de 4 Mb foi identificada em uma paciente com agenesia vaginal, útero rudimentar, alterações craniofaciais e dificuldade de aprendizagem. Uma coorte com 63 mulheres com MRKH também identificou uma paciente com deleção 22q11 (NIK-ZAINAL et al., 2011).

Em 17q12 estão localizados os genes *LHX1* e *HNF1B* que possuem função conhecida no desenvolvimento do sistema reprodutor e foram considerados genes candidatos para MRKH. *HNF1B* é expresso nos ductos mesonéfricos e paramesonéfricos e já foi associado com malformações genitais, diabetes e cistos renais (Al et al., 2022; SANDBACKA et al., 2013). Uma variante em heterozigose em

*HNF1B* foi reportada na literatura em duas pacientes com agenesia uterovaginal e diabetes familiar com idade de diagnóstico precoce (LINDNER et al., 1999). Porém, apesar de ser considerado um gene promissor, estudos posteriores não identificaram variantes em *HNF1B* em pacientes com MRKH (LEDIG et al., 2011; WILLIAMS et al., 2017).

Alterações no gene *LHX1* também já foram associadas previamente a MRKH. Esse gene atua durante o início do período embrionário, possuindo papel importante no desenvolvimento do sistema urogenital (SHY, 2016). Baseado em estudos utilizando modelo animal que demonstrou ausência de tubas uterinas, útero e porção superior do canal vaginal em camundongos (*Lhx1-null*), *LHX1* também é considerado um gene candidato (KOBAYASHI et al., 2004; LEDIG et al., 2012).

Em estudo conduzido por Ledig e colaboradores (2011) foi identificada uma variante *missense* em um grupo de 56 pacientes avaliadas, resultando em proteína truncada, o que poderia explicar o quadro clínico observado. Em 2012, a avaliação de um grupo de 62 mulheres com MRKH identificou uma mutação do tipo *frameshift* no gene *LHX1*, que resulta em *stop codon* prematuro. Autores concluem que a variante encontrada é relevante para o quadro clínico da paciente, já que a mutação impede a produção de uma proteína funcional (LEDIG et al., 2012).

Em adição, outra mutação em heterozigose do tipo *missense* localizada no gene *LHX1* também foi descrita posteriormente em paciente com MRKH, sugerindo que esse gene possa estar envolvido na patogênese da doença (ZHANG et al., 2017).

O fator de transcrição *TBX6*, localizado em 16p11.2, é também considerado gene candidato para MRKH já que atua durante o período embrionário na formação e diferenciação do mesoderma paraxial (HERLIN et al., 2014; TRIANTAFYLLIDI et al., 2022). *TBX6* pertence à família de genes T-box que codificam fatores de transcrição e foi associado a escoliose congênita em estudo realizado com população Chinesa (LEDIG; WIEACKER, 2018).

Variantes em *TBX6*, já foram reportadas em pacientes com anomalias müllerianas, incluindo MRKH. O sequenciamento desse gene em 167 mulheres identificou uma variante possivelmente patogênica em heterozigose (c.484G>A) em duas pacientes com MRKH e em três pacientes com anomalias de fusão dos ductos de Müller. A variante c.1015C>A também foi descrita nesse mesmo estudo em uma paciente com útero septado (TEWES et al., 2015).

Sandbacka et al. (2013) também identificou a variante c.484G>A. Nesse estudo, a variante encontrava-se presente em maior frequência no grupo de 112 pacientes quando comparado ao grupo controle. Entretanto, Tewes et al., (2019) observou a presença da mesma variante com frequência similar no grupo controle e no grupo de mulheres MRKH, sugerindo que essa mutação não está relacionada a desordens dos ductos de Müller. Em contrapartida, 4 variantes (c.358A>G, c.1146C>A, c.815G>A, c.1015C>A) foram identificadas nesse mesmo estudo, demonstrando uma possível associação entre anomalias dos ductos de Müller e variantes em *TBX6*.

O gene candidato considerado mais promissor para MRKH é o gene *GREB1L* (18q11.1-q11.2). Esse gene está envolvido na via de sinalização pelo ácido retinóico, importante para o desenvolvimento renal, atuando como coativador do gene *RAR* (receptor de ácido retinóico) e na regulação de genes como *WT1*, *LHX1* e *PAX2/8*. Apesar do papel exato de *GREB1L* ainda não ser completamente compreendido, a relação entre esse gene e o desenvolvimento do sistema genital e renal foi observada em pacientes com malformações renais e demonstrada em estudo com modelo animal (BROPHY et al., 2017; DE TOMASI et al., 2017; KYEI BARFFOUR; KWARKOH, 2021).

A avaliação de uma família incluindo duas primas com MRKH e agenesia renal unilateral e dois parentes do sexo masculino identificou uma nova variante patogênica *missense* em heterozigose em *GREB1L* (c.705G>T). A variante descrita foi transmitida através das duas mães não afetadas para as duas mulheres com MRKH e para um indivíduo do sexo masculino com agenesia renal bilateral, falecido logo após o nascimento. Autores sugerem que a alteração, herdada do avô materno com agenesia renal unilateral, apresenta penetrância incompleta, não podendo ser descartada a possibilidade de *imprinting* genômico (HERLIN et al., 2019).

Variantes em *GREB1L* também foram reportadas na literatura tanto em casos esporádicos quanto familiares de MRKH. Os achados descritos sugerem que *GREB1L* possui papel importante no desenvolvimento adequado de útero e rins, devendo ser avaliado em pacientes com MRKH ou agenesia renal. Em adição, variantes nesse gene também foram identificadas em pacientes com alterações auditivas, que podem fazer parte das alterações extragenitais e que estão presentes em cerca de 10 a 25% de mulheres portadoras de MRKH (JACQUINET et al., 2020; KYEI BARFFOUR; KWARKOH, 2021). Estudo acerca do gene *GREB1L*, que é expresso no mesoderma

intermediário, também foi conduzido Jolly et al. (2023). Os autores identificaram variantes patogênicas em *GREB1L* como potencialmente causadoras tanto de MRKH I quanto de MRKH II.

Conforme dito anteriormente, diversas CNVs já foram identificadas em pacientes com MRKH. Contudo, essas regiões podem conter múltiplos genes, o que dificulta a identificação de um gene causal. Tendo em vista esse grande desafio de elucidar a base genética envolvida nessa doença congênita, recentemente Brakta et al. (2023) reportaram na literatura o primeiro estudo utilizando mapeamento óptico genômico (OGM) na busca de variantes estruturais (SVs) em 87 pacientes com possível diagnóstico de MRKH. Dentre as alterações foram encontradas deleções, duplicações e três casos de mosaicismo. Os autores concluem que o mosaicismo pode estar envolvido na etiologia da MRKH (BRAKTA et al., 2023).

#### 4 ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

Relatos na literatura sobre gêmeas monozigóticas discordantes para o fenótipo de MRKH sugerem que outros mecanismos, como fenômenos epigenéticos, possam estar associados a etiologia da síndrome (STEINKAMPF; DHARIA; DICKERSON, 2003; MILSOM et al., 2015). Apesar da condução de diversos estudos empregando técnicas como *microarray* e sequenciamento, existem poucos trabalhos com abordagem epigenética.

A epigenética é caracterizada como o estudo de modificações na expressão gênica que não estão relacionadas a alterações na sequência do DNA. Os mecanismos epigenéticos incluem modificações de histonas, metilação do DNA e RNAs não codificantes (ncRNAs) (LI, 2021).

A metilação do DNA é um evento enzimático realizado por DNA metiltransferase (DNMT) onde as citosinas seguidas por guanina (dinucleotídeo CpG) recebem um grupamento metil na posição 5'. Algumas regiões do genoma possuem maior concentração de dinucleotídeos CpG, formando as ilhas CpGs, que estão presentes com frequência em regiões regulatórias como a região promotora de genes (MENG et al., 2015). Sabe-se que a metilação do DNA está envolvida em processos como *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X, proliferação e diferenciação

celular. Dessa maneira, alterações no perfil de metilação podem estar associadas ao desenvolvimento de doenças (LI, 2021).

Rall e colaboradores (2011) conduziram o primeiro estudo com avaliação de transcriptoma e níveis de metilação em oito pacientes com MRKH. Neste estudo, foram identificados 293 transcritos diferencialmente expressos quando comparado ao grupo controle e 194 sítios CpGs com diferentes padrões de metilação.

Autores identificaram que os genes *WT1* e *GATA4* estavam hipometilados em relação ao grupo controle. Sabe-se que ambos os genes participam de processos relacionados a determinação do sexo e diferenciação via *AMH*, promovendo expressão de *AMH* e consequente regressão dos ductos de Müller. Além de *WT1* ter papel importante no desenvolvimento do sistema urogenital, ele atua na transcrição do gene *AMH*. Dessa maneira, a ativação de *AMH* poderia levar a regressão parcial dos ductos de Müller em pacientes com MRKH (RALL et al., 2011).

O possível envolvimento de fatores epigenéticos como metilação em regiões de *imprinting* na etiologia da MRKH também está sendo avaliado, já que aproximadamente 100 genes no genoma humano sofrem *imprinting*. O *imprinting* genômico é caracterizado pelo controle da expressão gênica onde os dois alelos de um determinado gene são diferencialmente expressos de acordo com a origem parental. Dessa maneira, a repressão do alelo materno ou paterno resulta na expressão monoalélica do gene (TUCCI et al., 2019).

A Síndrome de Silver Russell (SRS), é uma desordem de *imprinting*, associada principalmente a hipometilação da região de controle de *imprinting* 1 (ICR1) e dissomia uniparental do cromossomo 7. Tendo como base descrições na literatura associando pacientes com MRKH e SRS, Eggermann e colaboradores (2018) buscaram mutações epigenéticas em *loci* imprintados que possuem associação com doenças de *imprinting*, incluindo ICR1, localizado em 11p15.5. Apesar da análise realizada não ter sido capaz de detectar alterações nos níveis de metilação nos cromossomos 6, 7, 11, 14, 15, 19 e 20, não exclui a possibilidade de epimutações em outras regiões que possam contribuir para etiologia da MRKH (ABRAHAM et al., 2015; EGGERMANN et al., 2018).

A presença de SRS e MRKH também foi descrita por Bruce et al. (2009). Neste estudo foi identificada extrema hipometilação de *H19* ICR1 em duas pacientes com características fenotípicas compatíveis com MRKH, sendo que uma delas apresentava agenesia vaginal e útero hipoplásico e a outra apresentava agenesia

uterina e dos 2/3 superiores do canal vaginal. Autores associaram o nível de metilação de *H19* a gravidade do fenótipo de SRS. Por outro lado, Sandbacka e colaboradores (2011) não identificaram associação entre hipometilação de *H19 ICR1* e o desenvolvimento de MRKH. Porém, os autores observaram redução da metilação do gene *H19* em 3/16 sítios estudados e concluíram que esse achado pode contribuir para o fenótipo de MRKH apesar da metilação normal de *H19 ICR1*.

## 5 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

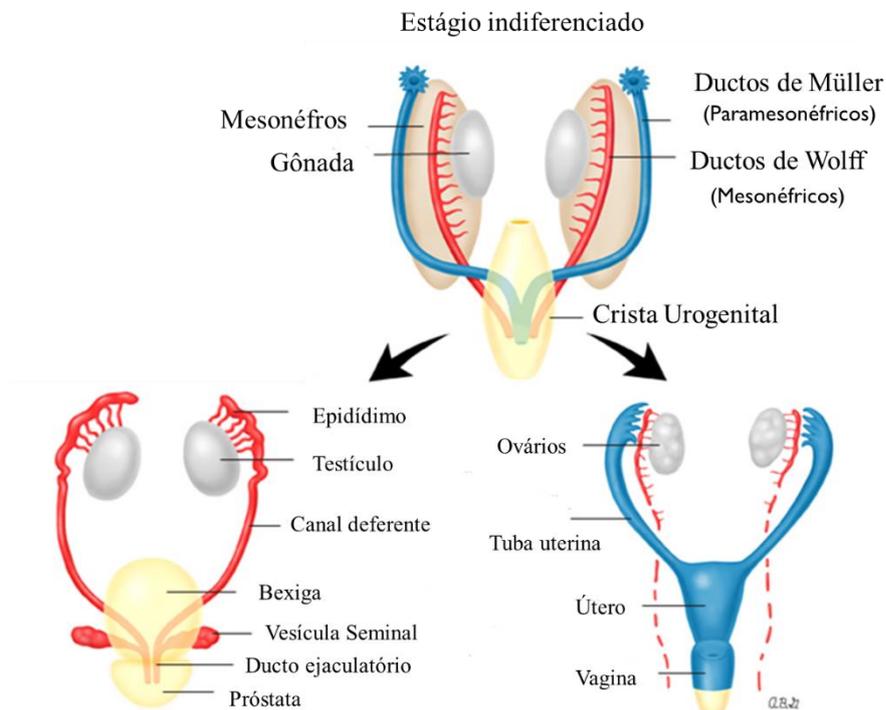
O diagnóstico da MRKH é baseado tanto na avaliação física da paciente, quanto no cariótipo e em exames de imagem. Existem diversas outras condições clínicas que podem se apresentar de maneira semelhante a MRKH. Por esse motivo, o diagnóstico diferencial deve ser realizado para excluir a possibilidade de outras alterações como aplasia vaginal isolada, DDS (principalmente a AIS), hímen imperfurado e septo vaginal transversal (SVT) (SOUSA et al., 2014; ACOG, 2018).

### 5.1 SÍNDROME DA INSENSIBILIDADE ANDROGÊNICA (AIS)

A AIS é considerada a desordem mais frequente no grupo 46, XY DDS, sendo caracterizada por disfunção do receptor androgênico (AR). O comprometimento desse receptor manifesta-se em diferentes graus de gravidade em cada indivíduo, resultando em um amplo espectro fenotípico (GULÍA et al., 2018). Dessa maneira, o AR possui papel fundamental no desenvolvimento embrionário, atuando no processo de diferenciação sexual masculina. Além disso, possui também função importante no desenvolvimento das características sexuais secundárias (TOUZON et al., 2019).

As gônadas bipotenciais, presentes no início do período embrionário, possuem a capacidade de desenvolver tanto testículos quanto ovários. Nesse estágio do desenvolvimento, os ductos de Wolff e de Müller estão presentes (**Figura 3**) (MAKIYAN, 2016; PIAZZA; URBANETZ; CARVALHO, 2011). Naqueles embriões cujo sexo cromossômico é 46, XY, o fator de determinação testicular, codificado pelo gene

SRY, inicia a partir da 6ª semana de gestação o processo de diferenciação da gônada primitiva em testículos (MANNAERTS et al., 2015).



**Figura 3.** Gônada bipotencial no estágio inicial de desenvolvimento embrionário. Presença dos ductos paramesonéricos e mesonéricos. Fonte: UpToDate.

Em resposta ao hormônio antimülleriano (AMH) secretado pelas células de Sertoli, os ductos de Müller regridem e os ductos de Wolf, sob ação da testosterona produzida pelas células de Leydig, se diferenciam em epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal (BATISTA et al., 2018).

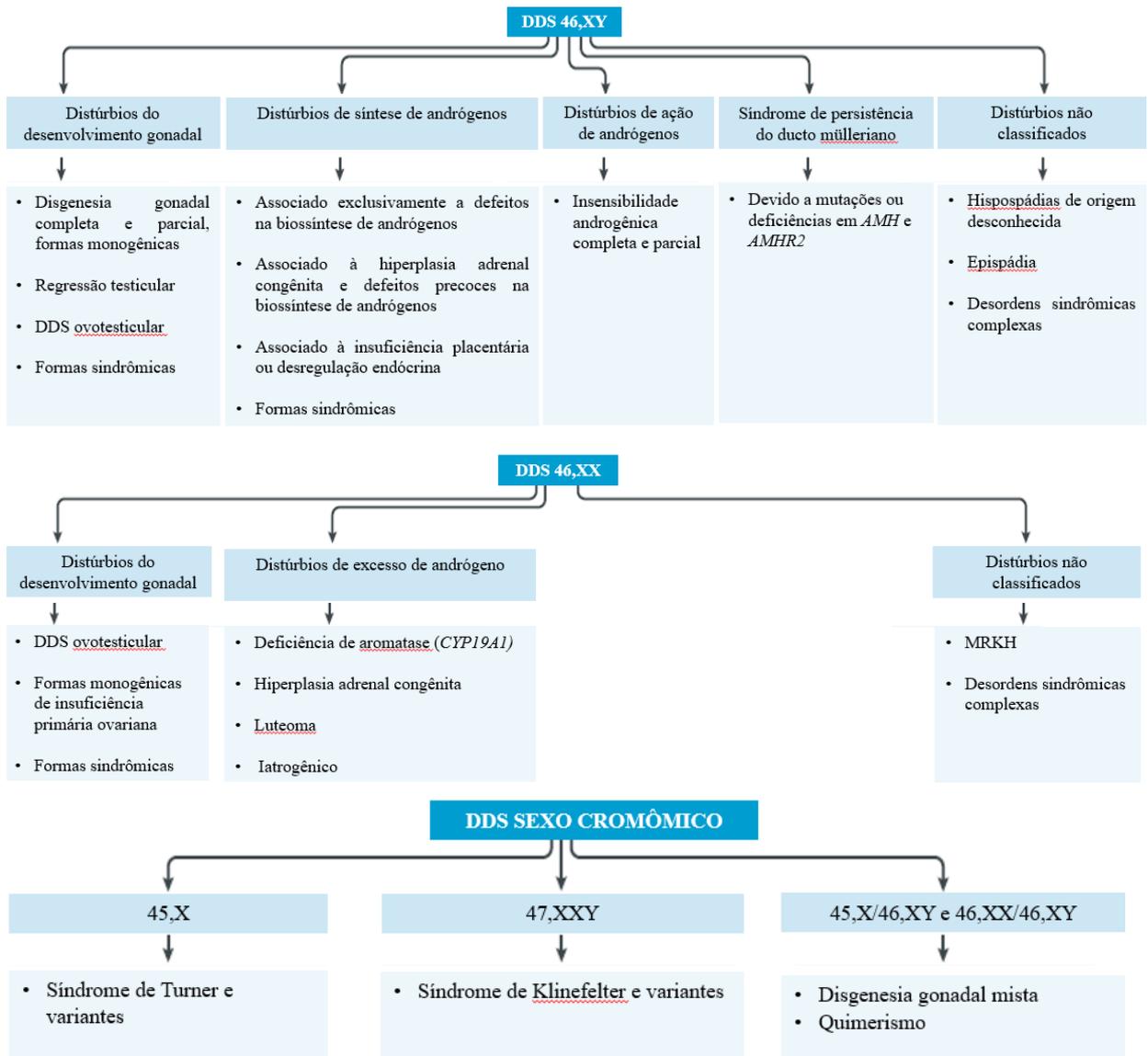
Por meio da ação da  $5\alpha$ -redutase, a testosterona previamente produzida é convertida em dihidrotestosterona, induzindo o desenvolvimento da próstata e da genitália externa masculina (ONO; HARLEY, 2013). Dessa maneira, a testosterona e a dihidrotestosterona desempenham papel fundamental na diferenciação sexual masculina e desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (BRINKMANN, 2001).

Esses dois hormônios esteroides possuem suas ações mediadas pelo AR. Portanto, a ausência desses hormônios ou até mesmo defeitos no AR levam ao desenvolvimento sexual masculino incorreto (TAN et al., 2015). O comprometimento

na função do AR resultará em indivíduos onde o sexo cromossômico e gonadal não correspondem ao fenótipo apresentado.

Com o avanço no entendimento dos mecanismos moleculares que podem levar a discordância entre o sexo anatômico, gonadal e cromossômico em um indivíduo, novas nomenclaturas foram sugeridas pelo Consenso de Chicago (2006) (LEE et al., 2006). Tendo em vista que termos como intersexo, sexo reverso e hermafroditismo são considerados estigmatizantes e potencialmente pejorativos, o termo “Distúrbios de Diferenciação Sexual” (DDS) passou a ser sugerido em substituição aos termos utilizados anteriormente (LEE et al., 2006).

As DDS possuem incidência de 1:4500 a 1:5000 nascidos vivos e podem ser divididas em 3 grupos tomando como base o cariótipo: (1) 46, XX DDS, que incluem desordens de desenvolvimento gonadal e excesso de andrógenos; (2) 46, XY DDS, neste grupo estão inclusos os distúrbios de desenvolvimento gonadal e distúrbios de ação ou síntese de andrógenos; (3) DDS sexo cromossômico, que incluem doenças como síndrome de Turner e Klinefelter (**Figura 4**) (LEE et al., 2006; WALIA et al., 2018).



**Figura 4.** Classificação DDS. Os distúrbios de diferenciação sexual (DDS) são classificados em três principais grupos, com base no cariótipo. Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH). Fonte: Adaptado de Cools et al., 2018.

A condição clínica mais comum dentro do grupo 46, XY DDS é a AIS (BATISTA et al., 2018). Ela possui herança recessiva ligada ao X e sua patogênese é decorrente da incapacidade de as células responderem aos andrógenos devido a variantes no *AR* (BARBAGALLO et al., 2021).

Essas variantes patogênicas no *AR* podem ocasionar comprometimento de função do receptor, afetando o desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos. Portanto, as diferentes características clínicas apresentadas pelos pacientes estão diretamente relacionadas as alterações encontradas no *AR* (GULÍA et al., 2018). Dessa maneira, a AIS foi classificada em três categorias distintas: completa (CAIS),

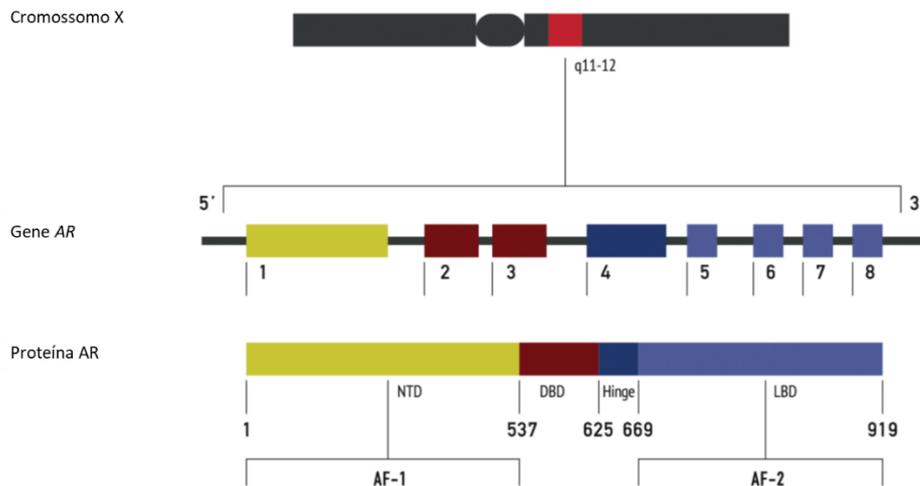
parcial (PAIS) ou moderada (MAIS), dependendo do grau de resistência a andrógenos (MONGAN et al., 2015).

A CAIS é decorrente de variante no gene *AR*, o que impede por completo que sua função seja realizada e é caracterizada por genitália externa feminina. Normalmente, o primeiro sinal observado é a amenorreia primária ou presença de hérnia inguinal na infância. Essas pacientes possuem ausência de útero, presença escassa de pelos axilares e pubianos, desenvolvimento espontâneo de mamas e testículos alojados em posições atípicas (TADOKORO-CUCCARO; HUGHES, 2014).

Já em pacientes com PAIS, a forma de apresentação clínica pode variar desde um fenótipo predominantemente feminino até genitália ambígua ou um fenótipo predominantemente masculino. No primeiro caso, os pelos pubianos estão presentes na genitália externa feminina e pode-se identificar hipertrofia de clítoris e fusão parcial ou completa dos lábios (SUBRAMANIAM et al., 2013). Na apresentação masculina é observado micro pênis, hipospádia severa e escroto bífido com ou sem criptorquidia. Já as formas mais ambíguas são diagnosticadas ao nascimento ou infância (HUGHES et al., 2012; MENDOZA; MOTOS, 2013).

Em indivíduos com MAIS o diagnóstico pode passar despercebido visto que geralmente possuem desenvolvimento masculino normal. Contudo, alguns casos podem apresentar ginecomastia, micropênis e infertilidade (BATISTA et al., 2018).

O gene *AR* é um fator de transcrição composto por 8 éxons que está localizado no cromossomo X (Xq11-q12) e é responsável por controlar a expressão de genes específicos (TAN et al., 2015; BATISTA et al., 2018). O gene *AR* possui quatro domínios funcionais, sendo eles: domínio N-terminal (NTD), domínio de ligação ao DNA (DBD), domínio de ligação ao andrógeno (LBD) e região *hinge* (**Figura 5**) (BARBAGALLO et al., 2021).



**Figura 5.** Representação da estrutura do gene *AR*. O receptor androgênico (*AR*) possui 8 éxons e codifica uma proteína de 919 aminoácidos, composta por diferentes domínios funcionais: o domínio N-terminal (NTD), o domínio de ligação ao DNA (DBD), o domínio de ligação ao andrógeno (LBD) e a região *Hinge*. Fonte: Adaptado de Batista et al., 2018.

O NTD, codificado pelo éxon 1, é o domínio mais variável entre os membros da família de receptores nucleares do hormônio esteroide. Nele está presente a região AF-1 que é necessária para completo funcionamento de AR, além de possuir importante função de ativação transcricional. Já o DBD é codificado pelos éxons 2 e 3, sendo considerado altamente conservado. O DBD possui dois dedos de zinco (*zinc fingers*) que permitem o reconhecimento de regiões específicas de DNA e ativação de genes alvo (DAVEY; GROSSMANN, 2016; POZZOBON, 2006).

Os éxons 4, 5, 6, 7 e 8 codificam o domínio LBD. Esse domínio contém a região AF-2 cuja ação é dependente de ligante e possui função importante na estabilização da estrutura proteica e interação entre NTD e coreguladores. Por último, temos a região *hinge*, codificada pelo éxon 4 e localizada entre o domínio DBD e o LBD. Essa região atua no transporte do AR do citoplasma para o núcleo e na mudança estrutural de AR dependente de ligante (LANCIOTTI et al., 2019).

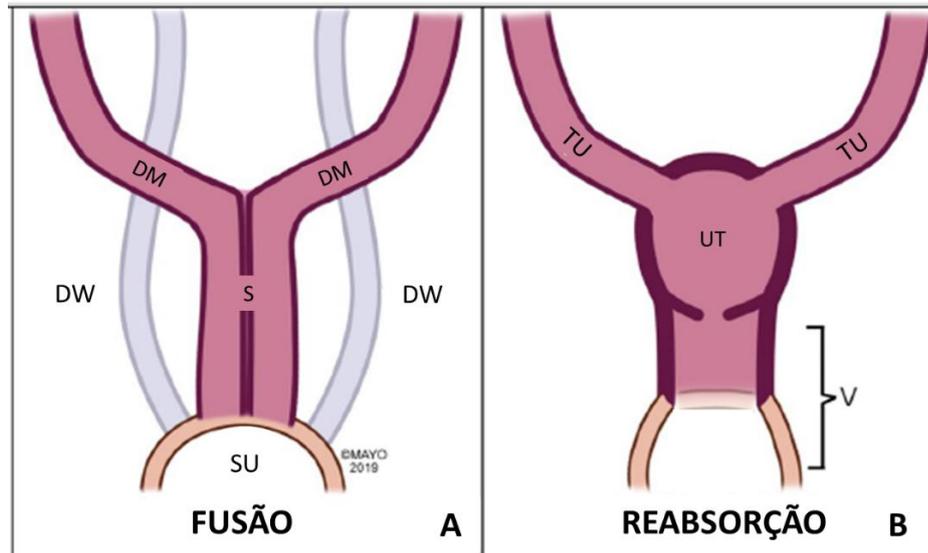
Diversas variantes relacionadas com AIS foram identificadas no *AR*. Dentre elas já foram descritas variantes de ponto, levando a substituição de aminoácido na proteína ou produção de códon de parada (*stopcodon*) prematuro; inserções ou deleções de nucleotídeos, que resultam na alteração de quadro de leitura (*frameshift*) e terminação prematura; deleção completa ou parcial do gene; e variantes intrônicas afetando o *splicing* do mRNA (BRINKMANN, 2001).

Variantes localizadas no éxon 1, que codifica o domínio NTD, são mais frequentemente encontradas em pacientes com a forma completa da síndrome. Apesar das poucas variantes descritas em pacientes diagnosticados com MAIS, a maior parte delas também são encontradas nesse éxon, enquanto nos indivíduos com PAIS, são mais frequentemente identificadas as variantes localizadas nos éxons 5 e 6 (BATISTA et al., 2018).

A maioria das variantes descritas em indivíduos com AIS são provenientes de substituições de base que provocam a troca de aminoácido. Grande parte das variantes no gene *AR* afetam o domínio LBD do receptor, influenciando na capacidade de ligação do AR aos andrógenos. Já as alterações que afetam o domínio NTD representam aproximadamente 20% e são frequentemente identificadas na CAIS. Cerca de 71% das variantes no éxon 1 resultam em *stopcodon* prematuro e 29% representam mutações do tipo *missense* (JÄÄSKELÄINEN, 2012).

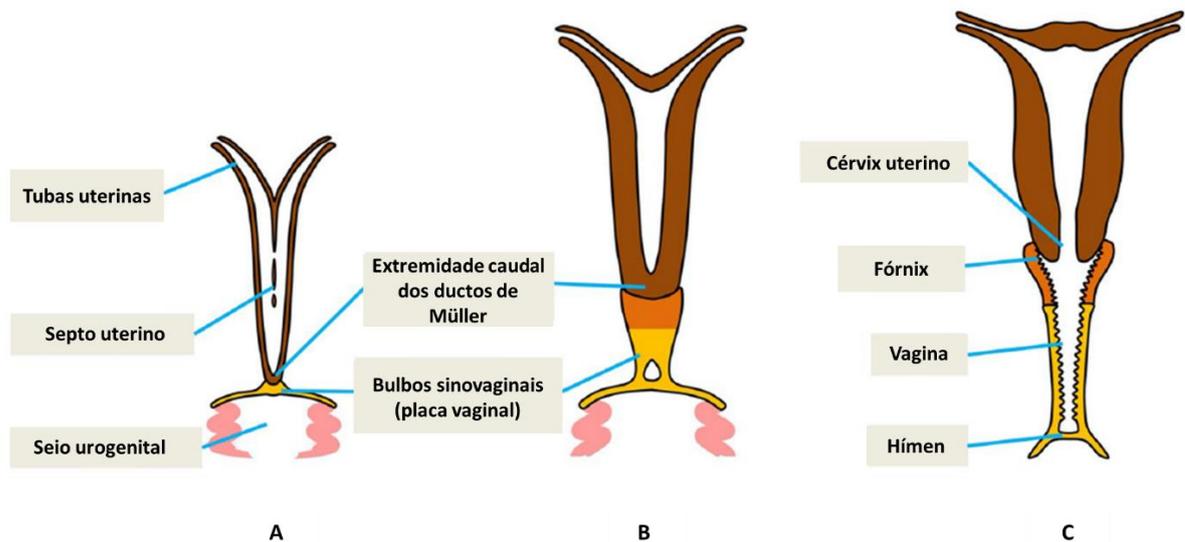
## 5.2 SEPTO VAGINAL TRANSVERSO E HÍMEN IMPERFURADO

Nos embriões que possuem o sexo cromossômico feminino, 46,XX, a falta de testosterona induz a involução dos ductos mesonéfricos e, devido à ausência das células de Sertoli, o AMH não é produzido. Isso, por sua vez, permite o desenvolvimento dos ductos de Müller (MIKHAEL et al., 2021; ONO; HARLEY, 2013; QUINT; MCCARTHY; SMITH, 2010). A porção caudal desse ducto sofre fusão, originando o útero, cérvix e porção superior do canal vaginal, enquanto a porção mais cranial, que não sofreu fusão, originará as tubas uterinas (**Figura 6**) (PITOT; BOOKWALTER; DUDIAK, 2020).



**Figura 6.** Desenvolvimento dos ductos de Müller. (A) Fusão da extremidade caudal dos ductos de Müller (DM), chegada ao seio urogenital (SU) e regressão dos ductos de Wolff (DW). (B) Reabsorção do septo (S) existente entre os DM, dando origem ao útero (UT) e vagina (V). Porção que não sofreu fusão dará origem as tubas uterinas (TU). Fonte: Adaptado de Pitot; Bookwalter; Dudiak, 2020.

O terço inferior da vagina tem sua origem no seio urogenital. À medida que as extremidades caudais dos ductos de Müller alcançam o seio urogenital, desencadeiam a formação dos bulbos sinovaginais, conforme ilustrado na **Figura 7**. Posteriormente, os bulbos proliferam, dando origem à chamada placa vaginal. Esse processo de proliferação resulta no aumento da distância entre o útero e o seio urogenital. Em fases posteriores do desenvolvimento embrionário, a porção central da placa vaginal sofre degeneração, resultando na formação da luz vaginal (canalização). Esta luz vaginal é separada do seio urogenital por uma membrana conhecida como hímen, a qual geralmente se rompe durante o período perinatal (SADLER, 2016; TANITAME et al., 2021).



**Figura 7.** Desenvolvimento do canal vaginal. **(A)** Porção caudal dos ductos de Müller já fundidas chega ao seio uterovaginal e promove a proliferação dos bulbos sinovaginais. **(B)** Proliferação dos bulbos sinovaginais e formação da placa vaginal. **(C)** canalização da vagina. Fonte: Adaptado de Tanitame et al., 2021.

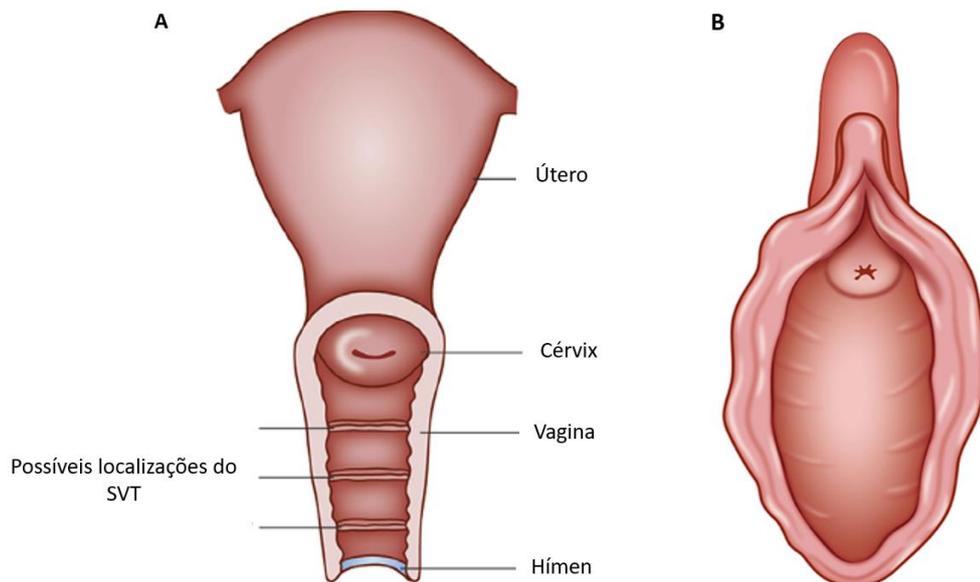
Acredita-se que uma falha durante o processo de canalização da placa vaginal possa dar origem ao SVT, condição congênita com incidência aproximada de 1:2100 a 1:72000. Para classificação do septo vaginal é levado em consideração sua localização, espessura e presença ou não de perfuração (**Figura 8A**). Dessa maneira, o SVT pode possuir diversas espessuras e estar localizado em diferentes posições ao longo canal vaginal, sendo o terço superior a localização mais frequente (BRANDER; VINCENT; MCQUILLAN, 2022).

Pacientes com SVT possuem uma apresentação clínica que varia a depender se o septo é completo ou incompleto. Naquelas pacientes que apresentam septo completo, os sintomas geralmente têm início na adolescência e incluem dor abdominal cíclica e queixa de amenorreia primária. A presença de massa abdominal pode ser decorrente do acúmulo sanguíneo na vagina ou no útero. Já em casos de septo incompleto, as mulheres podem apresentar queixa de dismenorreia e dispareunia. Dessa maneira, o diagnóstico antes da puberdade em pacientes com SVT é considerado um desafio (SINGH et al., 2015).

Assim como o SVT, o hímen também tem sua origem a partir do seio urogenital. Caso não ocorra o rompimento dessa estrutura no período perinatal, essa membrana permanece íntegra, condição que é chamada de hímen imperfurado e possui

incidência estimada de 1:1000 a 1:2000 mulheres (**Figura 8B**). Com o início da puberdade, a presença do hímen imperfurado promove acúmulo do fluxo menstrual gerando uma distensão da vagina, podendo ocasionar retenção urinária. Portanto, os sintomas incluem amenorreia primária, dor abdominal cíclica, retenção urinária e presença de massa abdominal (DIETRICH; MILLAR; QUINT, 2014a; EDMONDS; ROSE, 2013; TANITAME et al., 2021).

A etiologia das anomalias do trato reprodutor feminino ainda é obscura. Contudo, a descrição de ocorrência familiar e concomitante de hímen imperfurado e SVT, assim como a descrição de casos herdados de hímen imperfurado, sugere um componente genético (ABOUEDDAHAB; GUELZIM; KOUACH, 2022). Tanto o SVT quanto o hímen imperfurado constituem anomalias obstrutivas que podem se apresentar com amenorreia primária e vagina curta, portanto devem ser consideradas no diagnóstico diferencial com MRKH (ACOG, 2018).



**Figura 8.** Esquema representativo do septo vaginal transversal e do hímen imperfurado. **(A)** possíveis localizações do septo vaginal transversal (SVT). **(B)** Hímen imperfurado. Adaptado de Dietrich; Millar; Quint, 2014a.

## **6 JUSTIFICATIVA**

Considerando que a MRKH possui etiologia ainda obscura e frequentemente diagnosticada tardiamente, a condução de pesquisa nesse campo tem o potencial de contribuir significativamente para a identificação das causas associadas à síndrome e elucidar os mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento das estruturas do aparelho reprodutor feminino.

Com o avanço de técnicas moleculares, é relevante a utilização dessas metodologias como ferramentas de investigação. O entendimento dos mecanismos envolvidos na MRKH poderá contribuir para o diagnóstico correto, assim como influenciar na qualidade de vida das mulheres afetadas, manejo dos impactos psicológicos associados e fornecimento de aconselhamento genético.

## **7 OBJETIVO**

### **7.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de alterações genéticas que possam estar associadas à etiologia da MRKH, utilizando o sequenciamento de exoma.

### **7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

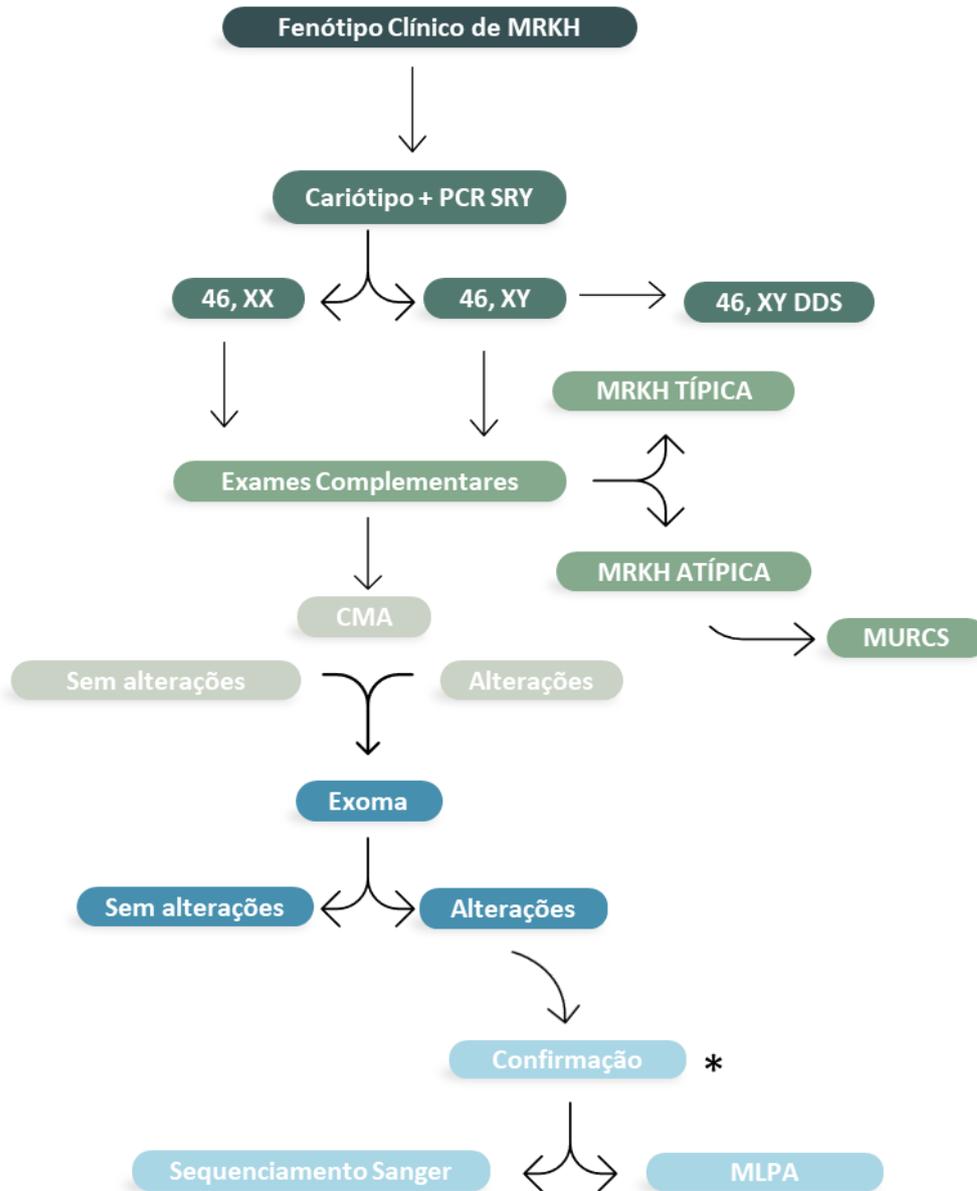
1. Investigar possíveis alterações genéticas no grupo de pacientes selecionadas;
2. Avaliar a ocorrência de variantes possivelmente causais neste grupo de pacientes;
3. Buscar relação entre as alterações encontradas e o quadro clínico das pacientes;
4. Realizar o diagnóstico diferencial.

## 8 METODOLOGIA

Na tentativa de compreender as bases moleculares que contribuem para o fenótipo observado em pacientes com MRKH, esse trabalho teve como objetivo utilizar sequenciamento de nova geração na busca de alterações que justifiquem o quadro clínico apresentado em um grupo de 18 pacientes. O presente trabalho foi realizado como continuação do trabalho de mestrado intitulado “Avaliação genética em mulheres diagnosticadas clinicamente com Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser”. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, conforme consta no anexo A (CEP-FM – CAAE: 60695716.1.0000.5558, Nº do parecer - 5.132.513).

Nosso estudo anterior contou com a participação de 14 mulheres com diagnóstico clínico prévio de MRKH. As pacientes participantes foram provenientes do Hospital Universitário de Brasília (HUB), assim como de outros estados do Brasil. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), essas mulheres foram submetidas a avaliação que permitiu descrever o conjunto de sinais clínicos observados e classificá-las em MRKH I, II e Associação de MURCS. Em adição, as pacientes selecionadas anteriormente também passaram por investigação genética utilizando o cariótipo, Análise Cromossômica por *Microarray* (CMA) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de *SRY* (CUNHA, 2018).

O atual estudo contou com a participação das 14 pacientes provenientes da nossa pesquisa anterior (P1 a P14), e foram incorporadas ao projeto quatro novas participantes (P15-P18). Todas as mulheres selecionadas foram submetidas às mesmas técnicas já empregadas em nosso trabalho anterior, incluindo cariótipo, CMA e PCR. Adicionalmente, foi acrescentado neste trabalho o sequenciamento de exoma. O sequenciamento Sanger foi utilizado em casos específicos: (1) confirmação da variante identificada em P2 por exoma e (2) avaliação dos genitores da paciente P6. O *Multiplex Ligation Probe Amplification* (MLPA) também foi utilizado como ferramenta para avaliação dos genitores da paciente P8 e como método confirmatório para a alteração identificada em P16 (**Figura 9**).



**Figura 9.** Fluxograma do estudo. \* O Sequenciamento Sanger e o MLPA foram utilizados em casos específicos.

## 8.1 SELEÇÃO DE PACIENTES

Neste trabalho foram avaliadas 18 pacientes. 14 previamente incluídas durante a execução do projeto de mestrado e quatro novas pacientes atendidas no ambulatório de Genética Médica do HUB. Os TCLEs foram assinados pelas pacientes e/ou seus responsáveis após a elucidação de dúvidas a respeito do estudo.

### 8.1.1 Critérios de Inclusão

1. Assinatura do TCLE pelas pacientes/responsáveis;
2. Apresentar suspeita clínica de MRKH.

## 8.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Para a execução das técnicas propostas no presente estudo, foi realizada a coleta de 4 a 8 ml de sangue periférico em dois tubos distintos. O sangue coletado em tubo com heparina foi utilizado para realização do exame de cariótipo enquanto o tubo contendo ácido etileno diamina tetracético (EDTA) foi utilizado para extração de DNA seguida dos seguintes testes: PCR para detecção de *SRY*, CMA, sequenciamento de exoma e, em casos específicos, sequenciamento Sanger e MLPA.

## 8.3 EXAME DE CARIÓTIPO

Para a realização do exame de cariótipo foram coletados de 4 a 8 ml de sangue periférico em tubo contendo heparina. Após o cultivo de linfócitos em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) por 72 horas a 37°C foi adicionado colchicina para obtenção das metáfases. Em seguida as amostras foram distribuídas em tubos *falcon* para centrifugação e retirada do sobrenadante e realizada a etapa de hipotonização.

Após fixação utilizando Carnoy I (3:1 Álcool Metílico / Ácido Acético Glacial), foi realizada a preparação das lâminas para análise em microscópio óptico seguidas de bandamento G e coloração com Giemsa.

## 8.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sangue periférico coletadas em tubos contendo EDTA seguindo o protocolo de rotina do laboratório.

A primeira etapa da metodologia consiste na lise celular utilizando 9 ml da solução de lise RBC (5mM de  $MgCl_2$  e 1mM EDTA pH 8,0) e 3 ml de sangue total colocados em tubo *falcon*. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente submetidas a centrifugação a 3400 rpm por igual período. O sobrenadante foi removido, deixando de 100 a 200  $\mu$ l de líquido residual e um *pellet* de células brancas. Após a ressuspensão do *pellet*, foi adicionado 3 ml da solução de lise celular (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS).

Para a segunda etapa foi adicionado 1 ml da solução de precipitação de proteína que contém 7,5 M  $NH_4Ac$  e 57,81g de acetato de amônia diluídos em 100 ml de água destilada. O tubo foi homogeneizado para se obter uma solução uniforme e submetidos novamente a centrifugação a 3400 rpm por 10 minutos, dando origem a formação de um *pellet* marrom.

O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo *falcon* com 3 ml de isopropanol 100%. A solução foi invertida diversas vezes até que ocorresse a formação de novelos de DNA e centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos dando origem a um *pellet* branco. Novamente o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 3 ml de etanol 70% seguido de centrifugação a 3400 rpm por 1 minuto. Após retirada do sobrenadante, os tubos foram deixados a temperatura ambiente por 15 minutos.

Para hidratação do DNA foi adicionado 200-250  $\mu$ l de tampão TE 1x e deixado a temperatura ambiente por 12-24 horas. O DNA foi armazenado entre 2-8°C.

## 8.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

No presente estudo foi realizada a técnica de PCR para detecção de *SRY*. As sequências dos *primers forward* e *reverse* foram obtidas de Settin et al. (2008) e possuem a seguinte sequência: 5'-CATGAACGCATTCATCGTGTGGTC-3' e 5'-CTGCGGGAAGCAAAGTCAATTCTT-3', respectivamente. Cada reação de 15 $\mu$ l

conteve: 0,3µl *primer forward* (10µM), 0,3µl *primer reverse* (10µM), 2,0µl MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1,0µl dNTPs (2mM), 3,0µL Buffer 10x, 0,15µL Taq *Platinum* (Invitrogen-5 U/µL), 2µl de DNA e 6,25µl de água MilliQ.

A reação de PCR foi realizada a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos para desnaturação; 65°C por 20 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 20 segundos para extensão. Por fim, 72°C por 10 minutos. O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado no transiluminador de luz UV.

## 8.6 ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY (CMA)

A técnica de CMA foi realizada em conformidade com as orientações do fabricante. No presente estudo foi empregada a plataforma *Cytoscan<sup>TM</sup> 750k* (*Affymetrix*) que permite realizar em alta resolução análise de alterações cromossômicas submicroscópicas no DNA. Sendo assim, permite identificar CNVs e perda de heterozigose por meio de 550.000 sondas não polimórficas e aproximadamente 200.000 sondas de SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) que estão distribuídas em um *chip* de DNA (*GeneChip<sup>®</sup>*).

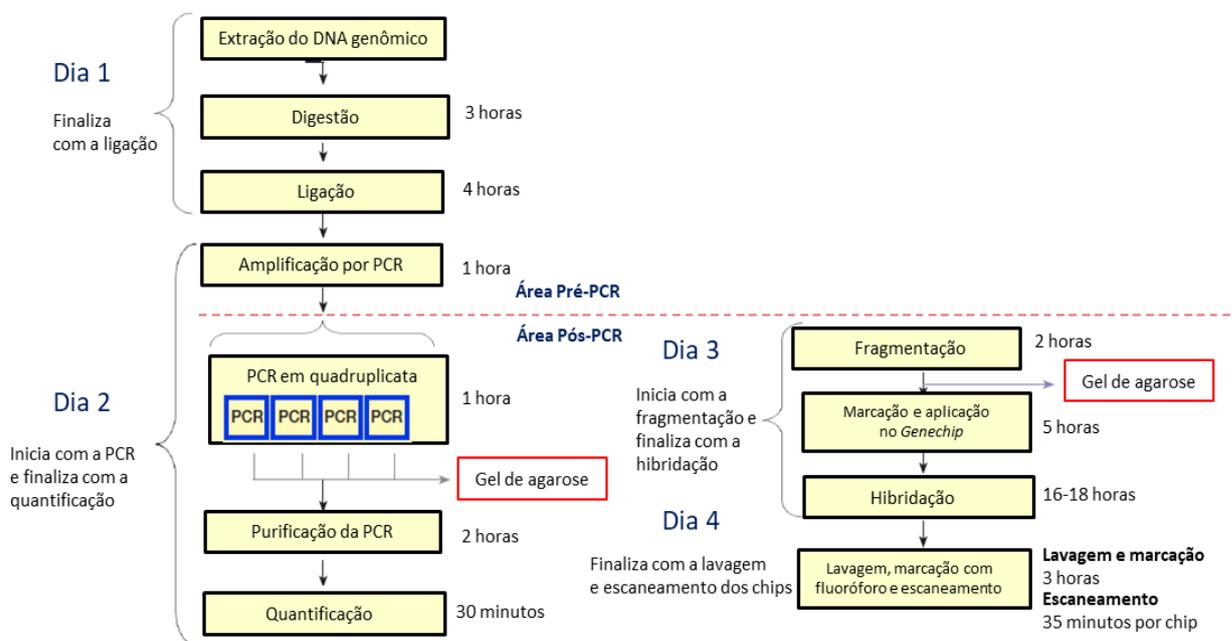
O DNA genômico extraído previamente foi diluído em *Low EDTA TE buffer* para ajuste de concentração para 50ng/µl. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para a etapa de digestão com a enzima de restrição *Nsp I* seguida da etapa de ligação de adaptadores com a *T4 DNA ligase*.

Os adaptadores ligados são reconhecidos pelos *primers* universais utilizados na etapa de PCR para amplificação das amostras. Uma alíquota do produto da PCR foi verificada em gel de agarose 2%. Os fragmentos devem se apresentar entre 150 e 2000 pb.

Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados utilizando *beads* magnéticas e quantificados no espectrofotômetro *Nanodrop<sup>®</sup> 2000* (*Thermo Scientific*, EUA). A seguir, foi realizada a fragmentação das amostras que foi confirmada em gel de agarose 4% com fragmentos entre 25 e 125 pb. A etapa seguinte consistiu na marcação do material com biotina e posterior aplicação das amostras no *GeneChip<sup>®</sup>*

para a incubação em forno de hibridação (*Hybridization Oven 645, Affymetrix, EUA*) por 16-18 horas a 50°C e 60 rpm.

Os chips foram submetidos a lavagem com tampões na estação automatizada *Fluidics Station 450 (Affymetrix, EUA)*, marcados com fluoróforos e escaneados no *GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix)*. Os resultados obtidos por meio dessa técnica foram analisados no *Chromosome Analysis Suite (ChAS) 2.0 software (Affymetrix)*. Foram utilizados como parâmetros para análise dos resultados o mínimo de 15 sondas para considerar uma região deletada e o mínimo de 30 sondas para duplicação. As etapas da técnica de CMA estão apresentadas na **Figura 10**.



**Figura 10.** Protocolo plataforma *Affymetrix Cytoscan 750k Array*.

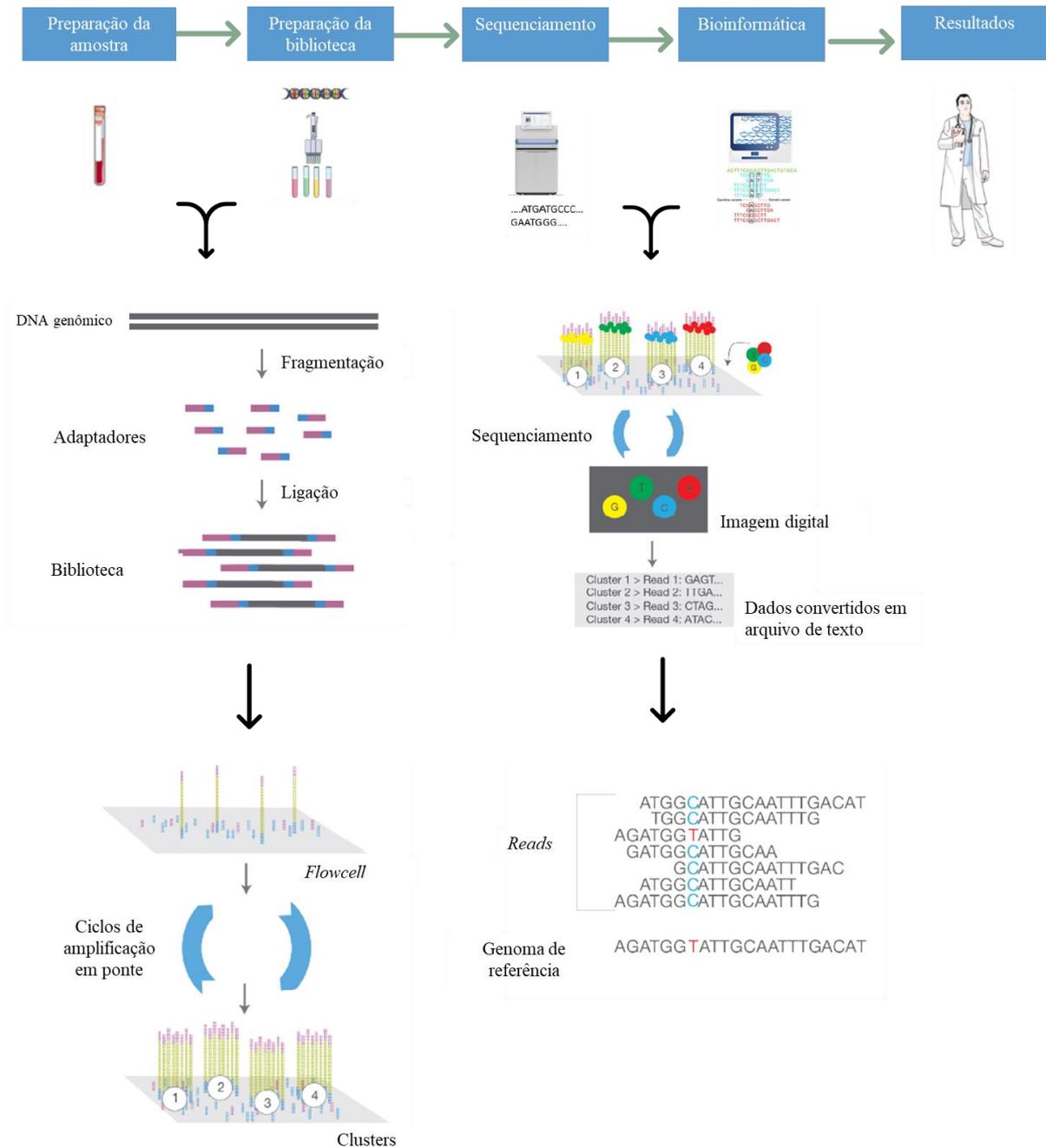
## 8.7 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA

O sequenciamento de exoma foi utilizado como estratégia na busca de variantes que justifiquem o quadro clínico observado nas pacientes. Essa técnica permite o sequenciamento das regiões codificantes, com alta cobertura dos éxons. Dessa maneira, contribui para investigação de variações em todo o genoma, sendo

considerada uma ferramenta relevante no processo de identificação de genes desconhecidos relacionados a doenças (GOH; CHOI, 2012; PEREIRA et al., 2015).

Para a realização do sequenciamento de exoma, algumas etapas básicas são necessárias. Essas etapas incluem: preparação da amostra, clivagem do DNA genômico, hibridização para captura das regiões de interesse, inserção de adaptadores nas extremidades dos fragmentos gerados, construção biblioteca, amplificação, sequenciamento e análise de bioinformática (**Figura 11**) (BAMSHAD et al., 2011; RETTERER et al., 2016).

As amostras de DNA foram enviadas para sequenciamento na *Macrogen Humanizing Genomics*, na Coreia do Sul. Foi utilizado o kit de captura *Illumina TruSeq Enrichment Kit®* e o sequenciamento foi realizado na plataforma *HiScanSQ Illumina*, conforme instruções do fabricante.



**Figura 11.** Etapas do sequenciamento de exoma. Fonte: Adaptado de Bayle et al., 2021 e Illumina INC., 2017.

### 8.7.1 Análise do exoma

A análise dos dados brutos obtidos pelo sequenciamento foi realizada no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, utilizando o *software* comercial *Franklin – Genoox®*. As variantes foram classificadas segundo as diretrizes do ACMG

(*American College of Medical Genetics*), podendo ser classificadas como: (1) patogênica, (2) possivelmente patogênica, (3) significado incerto (VUS), (4) possivelmente benigna e (5) benigna (RICHARDS et al., 2015).

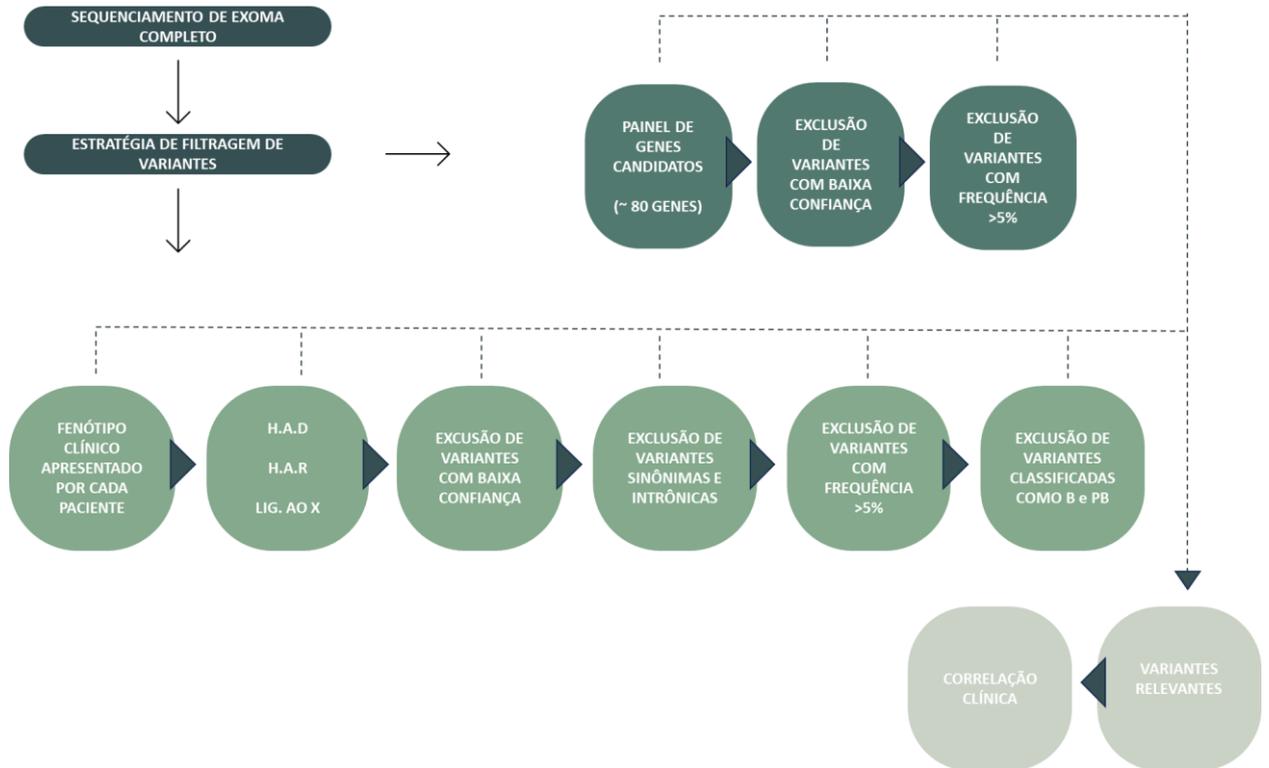
Segundo as diretrizes do ACMG, a classificação de patogenicidade das variantes envolve a avaliação de diversos critérios. Isso abrange a análise de informações obtidas através de ferramentas de predição *in silico*, bancos de dados de frequência populacional, estudos funcionais e análise de segregação.

Os critérios que definem a classificação das variantes como patogênica podem ser divididos em níveis de intensidade, como: muito forte (PVS1), forte (PS1-4), moderado (PM1-6) e critério de suporte (PP1-6). Por outro lado, cada critério benigno pode ser ponderado como *stand alone* (BA1), forte (BS1-4) e critério de suporte (BP1-6).

Para a análise das variantes foram utilizados bancos de dados públicos de frequência populacional, tais como: *Exome Aggregation Consortium* (ExAC), Arquivo Brasileiro Online de Mutações (AbraOM), *Genome Aggregation Database* (gnomAD), 1000 Genomes e *The Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP). Também foram utilizados banco de dados com informações de variantes associadas a doenças como *Clinical Variant Database* (ClinVar) e OMIM.

A plataforma utilizada para análise dos dados permite a aplicação de diversos filtros. Inicialmente, foi realizada uma estratégia de filtragem baseada no conjunto de características fenotípicas de cada paciente, classificação (patogênica, possivelmente patogênica e significado incerto) e tipo de herança (autossômico dominante, recessivo e ligado ao X). Foram removidas variantes com baixa cobertura, variantes sinônimas, intrônicas e variantes com frequência agregada >5% (**Figura 12**).

Posteriormente, foi utilizada outra estratégia de filtragem com a produção de um painel que engloba diversos genes já citados na literatura e que podem estar associados a MRKH e/ou desenvolvimento mülleriano (tabela 1). Após a filtragem, a análise das variantes restantes foi realizada de forma individual e foi verificada a compatibilidade da variante identificada e o quadro clínico apresentado. As variantes patogênicas em heterozigose para doenças recessivas não foram incluídas na análise.



**Figura 12.** Estratégias de filtragem utilizadas para análise de variantes . Benigna (B) e Possivelmente Benigna (PB).

**Tabela 1-** Genes do painel MRKH

Genes	Referência	Genes	Referência
<i>BAZ28</i>	Pan et al., 2019	<i>MYCBP2</i>	Takahashi et al., 2018
<i>CCR4</i>	Williams et al., 2016 ; Eksi et al., 2018	<i>NAALADL2</i>	Backhouse et al., 2019
<i>CFTR</i>	Mikhael et al., 2021 ; Eksi et al., 2018	<i>NBPF10</i>	Pan et al., 2019
<i>CMTM7</i>	Williams et al., 2016 ; Eksi et al., 2018	<i>NOTCH2NL</i>	Pan et al., 2019
<i>CNOT10</i>	Williams et al., 2016 ; Eksi et al., 2018	<i>OR1F1</i>	Eksi et al., 2018
<i>DACH1</i>	Davis et al., 2008	<i>OR2T2</i>	Chen et al., 2015
<i>DACH2</i>	Davis et al., 2008	<i>OR4M2</i>	Chen et al., 2015
<i>DERL2</i>	Ledig et al., 2018	<i>OXTR</i>	Brucker et al., 2017
<i>DLG5</i>	Chu et al., 2022	<i>PAX2</i>	Mikhael et al., 2021
<i>DLGH1</i>	Ravel et al., 2012	<i>PAX8</i>	Smol et al., 2020
<i>DOCK4</i>	Backhouse et al., 2019; Ledig et al., 2018	<i>PBX1</i>	Burel et al., 2006
<i>EMX2</i>	Eksi et al., 2018	<i>PDE11A</i>	Chen et al., 2015
<i>ESR1</i>	Brucker et al., 2017	<i>PIK3CD</i>	Pan et al., 2019
<i>GALT</i>	Klipstein et al., 2003	<i>PLCH1</i>	Ledig et al., 2018
<i>GATA3</i>	Chu et al., 2022	<i>PTPN3</i>	Takahashi et al., 2018
<i>GEN1</i>	Chu et al., 2022	<i>RAR</i>	Choussein et al., 2017
<i>GLI3</i>	Chu et al., 2022	<i>RARA</i>	Mendelsohn et al., 1994
<i>GREB1L</i>	Jacquinet et al., 2020	<i>RARB</i>	Mendelsohn et al., 1994
<i>HIRA</i>	Chu et al., 2022	<i>RBM8A</i>	Ledig et al., 2018 ; Eksi et al., 2018
<i>HNF1B</i>	Eksi et al., 2018	<i>RSPO4</i>	Backhouse et al., 2019
<i>HNRNPCL1</i>	Chen et al., 2015	<i>RXR</i>	Mendelsohn et al., 1994

<i>HOXA 9</i>	Rall et al., 2011	<i>SHOX</i>	Gervasini et al., 2010; Mikhael et al., 2021
<i>HOXA10</i>	Rall et al., 2011	<i>SLC4A10</i>	Pan et al., 2019
<i>HOXA11</i>	Rall et al., 2011	<i>SNAP29</i>	Ledig et al., 2018
<i>HOXA13</i>	Ekici et al., 2013	<i>SPECC1L</i>	Backhouse et al., 2019
<i>HOXD3</i>	Chu et al., 2022	<i>TBC1D1</i>	Chu et al., 2022
<i>IL32</i>	Williams et al., 2016 ; Eksi et al., 2018	<i>TBX6</i>	Tewes et al., 2019
<i>ITIH5</i>	Morcel et al., 2013	<i>TNK2</i>	Pan et al., 2019
<i>KLHL18</i>	Pan et al., 2019	<i>TP63</i>	Eksi et al., 2018
<i>KMT2D</i>	Chu et al., 2022	<i>TRIM32</i>	Ledig et al., 2018
<i>LAMC1</i>	Ravel et al., 2012	<i>TRIM71</i>	Eksi et al., 2018
<i>LHX1</i>	Ledig et al., 2012	<i>WNT4</i>	Biason-Lauber et al., 2004
<i>LRP10</i>	Backhouse et al., 2019	<i>WNT9B</i>	Mikhael et al., 2021
<i>MEFV</i>	Williams et al., 2016 ; Eksi et al., 2018	<i>WT1</i>	Choussein et al., 2017
<i>MH</i>	Oppelt et al., 2005	<i>ZNF200</i>	Williams et al., 2016 ; Eksi et al., 2018
<i>MHR</i>	Oppelt et al., 2005	<i>ZNF205</i>	Williams et al., 2016 ; Eksi et al., 2018
<i>MMP14</i>	Mikhael et al., 2021	<i>ZNF213</i>	Williams et al., 2016 ; Eksi et al., 2018
<i>MSL3</i>	Ledig et al., 2018	<i>ZNF277</i>	Ledig et al., 2018
		<i>ZNF816</i>	Chen et al., 2015

Tabela 1: Genes englobados no painel MRKH utilizado como estratégia de filtragem de variantes na plataforma *Franklin*.

## 8.8 MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

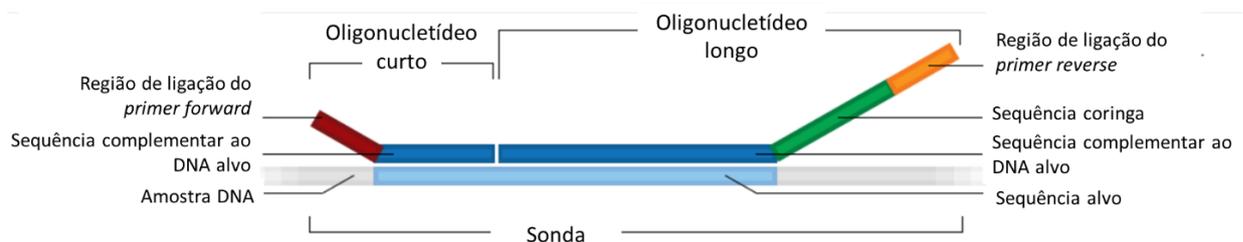
A técnica de MLPA foi utilizada no presente estudo como ferramenta para avaliação dos genitores da paciente P8, visando identificar se a dup7q11.23 é herdada. Além disso, essa metodologia também foi empregada para confirmar a presença da variante em *BRCA2* observada na paciente P16. A técnica de MLPA foi realizada em conformidade com as instruções do fabricante, utilizando os kits comerciais SALSA MLPA *Probemix* P064-C1 (MRC-Holland®) e SALSA MLPA *Probemix* P045-BRCA2/CHEK2.

A metodologia de MLPA permite a detecção de alterações de número de cópias do genoma de maneira simultânea em até 50 alvos distintos em uma mesma reação. O MLPA pode ser dividido em 5 etapas: (1) desnaturação do DNA e hibridização de sondas; (2) reação de ligação; (3) amplificação das sondas por PCR; (4) separação dos fragmentos por eletroforese capilar e (5) análise de dados (STUPPIA et al., 2012).

Inicialmente, foi realizada a quantificação do DNA genômico, extraído previamente, e foi ajustado a concentração para 50-100ng/μl. A primeira etapa do MLPA consiste na desnaturação de 5μl de DNA por 5 minutos a temperatura de 98°C, seguida da

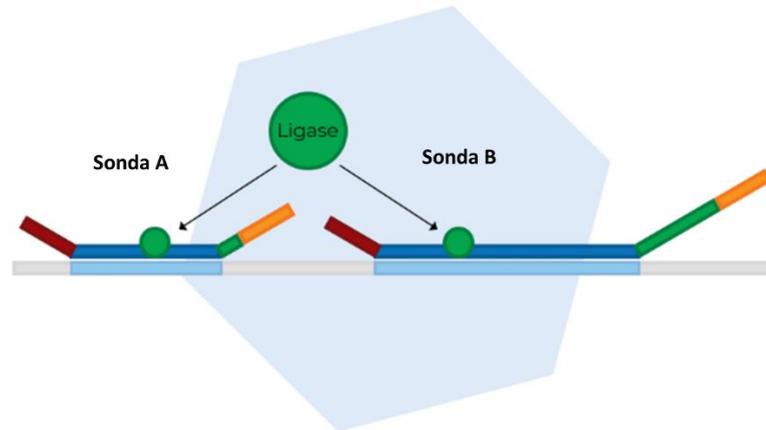
redução da temperatura para 25°C. Após a desnaturação, as amostras seguem para a reação de hibridização. Nessa etapa são acrescentados em cada amostra de DNA, 3µl do mix que foi composto de 1,5µl de MLPA *Buffer* e 1,5µl de *probemix*. As amostras foram mantidas por 1 minuto a 95°C e, em seguida, incubadas por 16-20 horas a 60°C.

As sondas utilizadas nessa etapa do MLPA são compostas por dois oligonucleotídeos que são complementares a sequência alvo e que se ligam a regiões adjacentes, sendo um deles curto e outro longo. Ambos possuem em suas extremidades uma região para ligação dos *primers*. No oligonucleotídeo longo, está presente uma sequência coringa, sem homologia com a sequência alvo, e que possui tamanho variável. A sequência coringa confere a cada sonda um comprimento distinto, permitindo a utilização de diversas sondas em uma mesma reação e, permite a separação dos fragmentos por tamanho na eletroforese capilar (**Figura 13**).



**Figura 13.** Estrutura das sondas utilizadas no MLPA. Fonte: MRC-Holland.

Após a hibridização das sondas à sequência alvo do DNA, foi adicionado a enzima que une as duas porções da sonda que se hibridizaram adequadamente, gerando um fragmento único (**Figura 14**). Para essa etapa, foi preparada a reação de ligação com 25µl de água, 3µl de ligase *buffer A*, 3µl de ligase *buffer B* e 1µl de enzima Ligase-65. As amostras foram colocadas no termociclador 54°C e foram adicionados 32µl do mix de ligação em cada reação de MLPA. As amostras foram homogeneizadas e mantidas por 15 minutos a 54°C, seguido de uma nova desnaturação de 5 minutos a 98°C para promover a separação das sondas previamente ligadas ao DNA genômico. Posteriormente, a temperatura foi reduzida para 20°C.



**Figura 14.** Etapa de ligação do protocolo de MLPA. Fonte: MRC-Holland.

Em seguida, foi preparado o master mix para reação de amplificação das sondas por PCR com a utilização de um único par de *primer*. Para cada amostra, foi utilizado 7,5µl de água, 2µl SALSA PCR *primer* mix e 0,5µl SALSA polimerase. Após a montagem do mix, 10µl foram distribuídos para cada amostra. O programa do termociclador consistiu em 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 20 minutos. Somente as sondas ligadas corretamente são amplificadas.

Por fim, 1µl de cada reação de MLPA foi diluído em 9µl de água. 1µl da amostra diluída foi adicionada a 9µl de formamida HID1 e 0,3µl de marcador Liz-500. A separação dos fragmentos por eletroforese capilar foi realizada utilizando o equipamento ABI-3500. Os dados obtidos foram analisados utilizando o *Software* comercial *Coffalyser* (MRC-Holland®). A análise é realizada de maneira comparativa, ou seja, as amostras testes são comparadas a amostras controle. Cada pico gerado corresponde ao produto de amplificação de uma sonda específica.

## 8.9 SEQUENCIAMENTO SANGER

O sequenciamento Sanger foi utilizado como método confirmatório para a variante possivelmente patogênica no gene *SPEN*, identificada em P2 pelo sequenciamento de exoma. Essa metodologia também foi utilizada para avaliar a

presença da variante possivelmente patogênica no gene *KYNU* nos genitores da paciente P6.

As sequências dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes *SPEN* e *KYNU* foram obtidas respectivamente de Légaré et al. (2015) e Zhang et al. (2011) (tabela 2).

**Tabela 2** - Sequência dos *primers* utilizados para sequenciamento

Gene	Segmento	Primer Forward	Primer Reverse
<i>SPEN</i>	Éxon 11	CACAGCATCACCCAGACTGT	AGTTGGTTACTGGGGGTAAGTGT
<i>KYNU</i>	Éxon 6	CCCGAGTTTGCTGTTTCATT	GATTGCTTGGAAAAGCCTAGTG

Tabela 2: Sequência dos *primers forward* e *reverse* utilizados para amplificação do éxon 11 do gene *SPEN* foi obtida de Légaré et al., 2015. Sequência dos *primers forward* e *reverse* utilizados para amplificação do éxon 6 do gene *KYNU* foi obtida de Zhang et al., 2015.

Para amplificação da região de interesse utilizando o *primer KYNU* e *SPEN*, cada reação conteve volume final de 15µl, conforme descrito na tabela 3. As condições da PCR estão demonstradas nas tabelas 4 e 5. A eficiência da amplificação foi avaliada em gel de agarose 1,5%.

**Tabela 3** - Reagentes utilizados para amplificação por PCR

Reagentes	Volume µl ( <i>Primer KYNU</i> )	Volume µl ( <i>Primer SPEN</i> )
<i>Primer Forward</i> (10µM)	0,6	0,6
<i>Primer Reverse</i> (10µM)	0,6	0,6
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5	0,45
dNTPs (2mM)	1,0	1,5
Buffer 10x	1,5	1,5
DMSO (Dimetilsulfóxido)	1,5	1,5
Taq <i>Platinum</i> (Invitrogen-5 U/µL)	0,2	0,2
Água MilliQ	7,7	7,65
DNA (50-300ng/µl)	0,4	1,0

**Tabela 4** - Condições da PCR utilizando o *primer KYNU*

Temperatura	Duração	Ciclo
95°C	1 minutos	1
95°C	45 segundos	35
56°C		
72°C		
72°C	10 minutos	1
10°C	∞	-

**Tabela 5** - Condições da PCR utilizando o *primer SPEN*

Temperatura	Duração	Ciclo
95°C	1 minutos	1
95°C	45 segundos	35
52°C		
72°C		
72°C	10 minutos	1
10°C	∞	-

As amostras amplificadas por PCR foram purificadas utilizando o kit comercial *MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)*, conforme orientações do fabricante. Após a purificação, as amostras foram enviadas para BPI Biotecnologia Pesquisa e Inovação para o sequenciamento Sanger. O sequenciamento automático por eletroforese capilar foi realizado no equipamento *ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* e a análise dos eletroferogramas foi realizada utilizando o programa *Chromas*.

## 8.10 MODELAGEM MOLECULAR

O estudo de modelagem molecular foi realizado nas variantes do tipo *missense* identificadas pelo sequenciamento de exoma nos genes *RET* e *AR*. Não foi possível realizar o estudo de modelagem molecular das variantes *missense* nos genes *MAMLD1* e *GLI3*, pois não há estruturas dessas proteínas disponíveis no banco de dados.

Diversas estruturas cristalográficas foram obtidas do *Protein Data Bank* para análise estrutural em cada caso. Para o domínio tirosina quinase do receptor *RET*, a estrutura 2IVT, com resolução de 2,60 angstroms, foi selecionada por apresentar o *RET* humano *wild type* em complexo com AMP (adenosina monofosfato), um análogo do ligante ATP (adenosina trifosfato). Para o domínio de ligação ao ligante do *AR*, a estrutura 1T7R, com resolução de 1,4 angstroms, foi escolhida devido à sua excelente densidade eletrônica e resolução. Os programas Coot e Pymol foram utilizados para analisar as estruturas e densidades eletrônicas, introduzir mutações e gerar as figuras. No caso do *AR*, o programa Alphafold v2.2.3 foi utilizado para modelar a estrutura com a mutação.

## 9 RESULTADOS

O trabalho aqui apresentado foi realizado como continuação do trabalho de mestrado intitulado “Avaliação genética em mulheres diagnosticadas clinicamente com Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser”. Neste estudo anterior, 14 pacientes com fenótipo clínico de MRKH foram avaliadas pelas técnicas de cariótipo, CMA e PCR para detecção do gene *SRY*. Ao longo desse estudo prévio, foram conduzidas avaliações por equipe multiprofissional formada por médico geneticista, ginecologista, radiologista e endocrinologista (CUNHA, 2018).

As avaliações, em conjunto com os testes realizados, permitiram confirmar o diagnóstico de MRKH em 10 pacientes e classificá-las em tipo I, II e associação de MURCS. Neste grupo de mulheres com MRKH, os cariótipos foram normais para o sexo feminino e a detecção de *SRY* foi negativa. Em apenas duas pacientes foram

identificadas alterações por meio do CMA: em P6 foi observada uma deleção intersticial de 1,1Mb no braço longo do cromossomo 6, afetando a banda q14.3 (arr[hg19] 6q14.3(86,635,033-87,762,722)x1) e em P8 foi identificada uma duplicação intersticial de 1,4Mb no braço longo do cromossomo 7 (arr[hg19] 7q11.23(72,732,834-74,136,633)x3) (CUNHA, 2018).

As outras quatro pacientes, também tiveram CMA sem alterações. Contudo, foram reclassificadas: P11, que possui cariótipo normal para o sexo feminino e *SRY* negativo, apresenta outra categoria de malformação mülleriana diferente da MRKH; P12, que possui cariótipo 46,XY normal e *SRY* positivo, foi classificada dentro do grupo de distúrbio de diferenciação sexual 46,XY; P4 e P10 ambas com cariótipo normal para o sexo feminino e negativas para *SRY* não apresentavam os critérios necessários para o diagnóstico de MRKH, mas não foi possível estabelecer o diagnóstico (CUNHA., 2018).

Os resultados obtidos no trabalho anterior, ressaltam a importância do diagnóstico das pacientes com alterações müllerianas, deixando evidente que uma equipe multidisciplinar é imprescindível para o correto diagnóstico e manejo dessas mulheres. A detecção de alterações no CMA somente em 2 pacientes diagnosticadas com MRKH, sugere que outros aspectos possam estar associados a patogênese dessa condição. Ainda, não se pode desconsiderar que outras alterações não identificadas pela técnica de CMA estejam relacionadas ao quadro.

A etiologia ainda obscura da MRKH e a identificação de quatro mulheres sem diagnóstico clínico conclusivo, nos motivaram a continuar o estudo com a inclusão de novas metodologias na avaliação dos quadros clínicos e inclusão de quatro novas pacientes que passaram pelo fluxograma de análise apresentado anteriormente (**Figura 9**).

## 9.1 DESCRIÇÃO DAS NOVAS PACIENTES INCLUÍDAS NESTE TRABALHO

### Paciente 15

Paciente de 12 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Relata história de amenorreia primária. Aos 11 anos de idade apresentou dores abdominais. Paciente relata episódios de dores na bexiga e os exames de imagem evidenciaram hematocolpo. Refere duas cirurgias para correção da malformação vaginal com complicações pós-operatórias.

No exame ginecológico foi observado desenvolvimento normal das características sexuais secundárias, genitália externa feminina sem alterações e vagina de aproximadamente de 3 cm com presença de septo vaginal com pertuito de 3 mm. O USG pélvico evidenciou vagina superior ao septo.

USG renal e de vias urinárias evidenciou sistema coletor duplo bilateral e criptomenorreia com possível hematossalpinge. Paciente foi encaminhada para histeroscopia diagnóstica, com confirmação de presença de SVT e correção cirúrgica.

RM de pelve revelou útero em anteversoflexão (AVF) com forma, contorno e dimensões normais. Ovário direito (OD) tópico, com forma conservada e sinal habitual. Ovário esquerdo (OE) com dimensões aumentadas e formação cística.

Ao exame físico não chama atenção para dismorfias. Paciente relata que aos 10 anos de idade teve um acidente vascular encefálico. A RM de crânio não revelou alterações. Eletrocardiograma sem alterações.

Na análise de metáfases obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

## Paciente 16

Paciente atendida no ambulatório de genética do HUB pela primeira vez aos 13 anos de idade, filha de pais não consanguíneos. Ao nascimento foi observada imperfuração anal com correção cirúrgica. Possui dificuldade para urinar, utiliza catéter e apresenta infecções urinárias recorrentes.

Paciente relata dores pélvicas cíclicas, ausência de menarca e telarca aos 11 anos de idade. Ao exame físico apresenta face alongada, prognatismo mandibular, tórax com áreas de hiperchromia, microcefalia, assimetria facial, hiperextensibilidade de grandes articulações, discreta alteração de orelhas, descontinuidade do trago, polegar direito lateralizado e com implantação mais proximal. No exame ginecológico apresenta genitália externa feminina hipodesenvolvida, pilificação normal, clitóris rudimentar e plano e ausência de introito vaginal.

Os exames de imagem apresentados pela paciente possuem resultados discordantes. O USG pélvico abdominal revelou útero em AVF de tamanho reduzido com textura homogênea, OD tópico com tamanho reduzido para faixa etária, OE não visualizado. No USG de rins e vias urinárias foi observado rins tópicos, de forma, contorno e dimensões normais. Ausência de sinais de hidronefrose ou cálculos. Foi evidenciado líquido anecóico no interior da vagina e cavidade endometrial.

A RM evidenciou útero e ovários, volumosa dilatação cística do canal vaginal de contorno regular e paredes finas, comprimindo o reto posteriormente e a bexiga anteriormente, o que pode representar hidrocolpo por hímen imperfurado. Os rins foram identificados em sua localização anatômica habitual com hidronefrose a direita, que pode ser decorrente da lesão compressiva. Nota-se estrutura tubular a esquerda contendo líquido em seu interior, sugestiva de hidrossalpinge.

No exame de cintilografia renal estática foi identificado rim esquerdo (RE) tópico, de forma e dimensões alteradas. Rim direito (RD) tópico, de forma alterada, dimensão menor que o contralateral e função tubular reduzida. Na cintilografia renal dinâmica, foi observado RE sem alterações e RD de forma alterada e com dimensão menor que o RE. Paciente relata que raio X de coluna total não identificou alterações. Ecocardiograma sem alterações.

Aos 16 anos de idade paciente foi internada para procedimento cirúrgico. Foi identificado óstio uretral junto à parede vaginal (persistência do seio urogenital).

Durante a cirurgia foi realizada a separação da vagina e da uretra e confecção de neouretra e vaginoplastia.

Em USG pélvico mais recente, realizado aos 19 anos de idade, foi relatada anatomia do útero de difícil caracterização com alterações sugestivas de duplicação e OD com volume aumentado, sugerindo tumor, endometrioma ou cisto hemorrágico. A RM realizada mais recentemente revelou útero em AVF com volume aproximado de 83,3cm<sup>3</sup>, notando-se um corpo principal a esquerda e pequeno corno rudimentar direito, comunicando-se ao colo uterino. Também foram observados ovários tópicos, sendo descartada a hipótese de formação tumoral.

Na análise de metáfases obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

## **Paciente 17**

Paciente de 36 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Ao exame físico não apresenta distorções.

Relata amenorreia primária. No exame ginecológico foi observado ausência de colo uterino e vagina em fundo cego. Aos 13 anos de idade teve início um quadro de dores abdominais cíclicas, que ocorriam mensalmente. Aos 32 anos foi encaminhada para investigação por aumento de volume abdominal e perda de peso ponderal.

O USG realizado revelou malformação mülleriana. Realizou laparotomia exploratória onde foi observado ascite volumosa, peritônio parietal espessado, útero hipoplásico, tubas uterinas tortuosas e dilatadas, ovários rudimentares, ausência de omento maior e menor, encurtamento de intestino grosso e delgado. Foi realizada pan-histerectomia. Possui rins com contorno, dimensões e densidades normais. Raios X de coluna cervical, torácica e lombo-sacra não identificaram alterações.

Na análise de metáfases obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

### **P18**

Paciente de 25 anos de idade, atendida no ambulatório de genética do HUB, filha de pais não consanguíneos. Relata amenorreia primária, sem queixa de dispareunia e dores abdominais cíclicas. Realizou diversos USG, porém com resultados inconsistentes. Tomografia computadorizada de abdômen total demonstrou agenesia uterina, ovários não visualizados e rins ectópicos localizados na pelve com aspecto em ferradura.

Na análise de metáfases obtidas da cultura temporária de linfócitos do sangue periférico, apresentou cromossomos normais em número e em estrutura. O cariótipo determinado foi 46, XX, característico de pessoa do sexo feminino.

Na investigação de perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos pela análise cromossômica por *microarray* não foram detectadas alterações.

## **9.2 SÍNTESE DOS RESULTADOS**

Com a avaliação de 18 pacientes, foi possível confirmar o diagnóstico clínico de MRKH em 12 delas (P1-P3, P5-P9, P13, P14, P17 e P18). Em uma das pacientes avaliadas (P15) foi identificada a presença de SVT. A análise do exoma permitiu a conclusão do diagnóstico de duas participantes (P10 e P12), que ainda não tinham seu diagnóstico estabelecido, como portadoras de Síndrome de CHARGE e AIS, respectivamente. P4 e P16 permaneceram sem diagnóstico definido e P11 apresenta outra categoria de malformação mülleriana diferente da MRKH. Os resultados obtidos pelas técnicas realizadas e as características das pacientes participantes deste trabalho estão descritas na tabela 6 e 7.

**Tabela 6** - Resumo das características clínicas e resultados do cariótipo, PCR e CMA das participantes do estudo (continua)

PACIENTES	IDADE (anos)	CANAL VAGINAL (cm)	ÚTERO	OVÁRIOS	ALTERAÇÕES ENCONTRADAS	CARIÓTIPO	PCR SRY	CMA	TAMANHO DA ALTERAÇÃO	DIAGNÓSTICO
P1	25	NA	Ausente	Tamanho inferior	Prolapso da valva mitral/insuficiência mitral	46,XX	N	Sem alterações	-	MRKH II
P2	28	1,4	Ausente	Sem alterações	Diminuição dos espaços vertebrais	46,XX	N	Sem alterações	-	MRKH II
P3	22	1,5	Ausente	Aspecto micropolicístico	CIA, CIV e PCA	46,XX	N	Sem alterações	-	MRKH II
P4	22	2	Rudimentar	Sem alterações	Microcálculo no grupamento caliciar inferior do RD. Hipoplasia de disco intervertebral de L5-S1. Registro de duas extrassístoles supraventriculares isoladas. Rebaixamento na função coclear bilateral	46,XX	N	Sem alterações	-	SDD
P5	41	Dilatação natural	Ausente	Atróficos	Escoliose	46,XX	N	Sem alterações	-	MRKH II
P6	38	8,5*	Ausente	Posição mais cranial. Formações císticas	RD ausente; RE pélvico com aneurisma no ramo arterial distal e caliectasia. Vértebra de transição lombossacra com megapófise transversa esquerda neoarticulada ao sacro. Perda auditiva em altas frequências	46,XX	N	Deleção 6q14.3 arr[hg19] 6q14.3(86,635,033-87,762,722)x1	1,1 Mb	MURCS
P7	41	4,6	Ausente	Sem alterações	-	46,XX	N	Sem alterações	-	MRKH I
P8	29	3,3	Presença de corno uterino	Sem alterações	Escoliose/Osteofitose	46,XX	N	Duplicação 7q11.23 arr[hg19] 7q11.23(72,732,834-74,136,633)x3	1,4 Mb	MRKH II
P9	29	6,1**	Rudimentar	Sem alterações	Osteofitose/Redução do espaço intervertebral T11-T12	46,XX	N	Sem alterações	-	MRKH II

**Tabela 6 –** Resumo das características clínicas e resultados do cariótipo, PCR e CMA das participantes do estudo (conclusão)

PACIENTES	IDADE (anos)	CANAL VAGINAL (cm)	ÚTERO	OVÁRIOS	ALTERAÇÕES ENCONTRADAS	CARIÓTIPO	PCR SRY	CMA	TAMANHO DA ALTERAÇÃO	DIAGNÓSTICO
P10	12	NA	Ausente	Ausente	RE ausente. Costelas cervicais rudimentares e malformação de coluna	46, XX	N	Sem alterações	-	CHARGE
P11	32	3,9	Septado em retroversão	Sem alterações	-	46, XX	N	Sem alterações	-	MÜ
P12	29	9,5	Ausente	OD com cisto	-	46, XY	P	Sem alterações	-	AIS
P13	33	Somente terço inferior	Ausente	OE ausente	-	46, XX, 22pstk+	N	Sem alterações	-	MRKH I
P14	29	1	Ausente	Sem alterações	Escoliose	46, XX	N	Sem alterações	-	MRKH II
P15	12	3	Em AVF, normal	OE com cisto	Hematocolpo; SVT	46, XX	N	Sem alterações	-	SVT
P16	13	Ausência de introito vaginal	Em AVF, com corpo principal a esquerda e pequeno corno rudimentar direito	OD com volume aumentado	Ânus imperfurado; RD de forma alterada, dimensão menor que o RE e função tubular reduzida	46, XX	N	Sem alterações	-	SDD
P17	36	NA	Rudimentar	Rudimentares	Alterações intestinais	46, XX	N	Sem alterações	-	MRKH I
P18	25	N	Ausente	Não visualizados	Rins pélvicos (em ferradura)	46, XX	N	Sem alterações	-	MRKH II

Tabela 6: Resultados provenientes das técnicas de cariótipo, PCR e CMA e resumo das características clínicas obtidas por meio das avaliações complementares. Ovário direito (OD); ovário esquerdo (OE); comunicação interatrial (CIA), comunicação interventricular (CIV), persistência do canal arterial (PCA); rim direito (RD); rim esquerdo (RE); sem diagnóstico definido (SDD); anomalia mülleriana (MÜ); Síndrome da Insensibilidade Androgênica (AIS); Septo Vaginal Transverso (SVT); realização de cirurgia para construção de neovagina (\*); dilatação natural (\*\*); positivo (P); negativo (N); não avaliado (NA); útero em anteversoflexão (AVF).

**Tabela 7 - Variantes identificadas por sequenciamento de exoma.**

PAC.	GENE	ÉXON	POSIÇÃO	VARIAÇÃO	CONSEQ.	EFEITO	NÚMERO DE CÓPIAS	CLASSIFICAÇÃO ACMG	CADD/REVEL
P1	WT1	5'UTR	chr11:32452091	c.-8_-7delGC			Heterozigose	B (BA1, BS2, BP6, BP7)	
P2	SPEN	11	chr1-16262492	c.9758_9759delCT	p.Pro3253fs	Frameshift	Heterozigose	PP (PVS1, PM2)	
P3	-	-	-	-	-	-	-	-	
P4	ESR1	3'UTR	chr6:152420158	c.*57T>C			Heterozigose	VUS (PM2, BP7)	
P5	WT1	5'UTR	chr11:32452091	c.-8_-7delGC			Heterozigose	B (BA1, BS2, BP6, BP7)	
P6	KYNU	6	chr2:143713777	c.447dupT	p.Lys150fs	Frameshift	Heterozigose	PP (PVS1, PM2)	
	RET	12	chr10:43612083	c.2188C>G	p.Leu730Val	Missense	Heterozigose	VUS (PM2, PP3)	23.3/0.77
	Del6q14.3		chr6:87.725.043-87.726.161				Heterozigose	VUS 0,00	
P7	WT1	5'UTR	chr11:32452091	c.-8_-7delGC			Heterozigose	B (BA1, BS2, BP6, BP7)	
	WNT4	5'UTR	chr1:22469459	c.-45delC			Heterozigose	VUS (PM2, BP7)	
P8	Dup7q11.23		chr7:72717385-74133271				Heterozigose	P +1,00	
P9	WT1	5'UTR	chr11:32452091	c.-8_-7delGC			Heterozigose	B (BA1, BS2, BP6, BP7)	
P10	CHD7	Intron 25	chr8:61763045	c.5405-7G>A		Splice region	Heterozigose	P (PM2, PP3, PP5)	
P11	MAMLD1	3	chrX:149638884	c.964C>T	p.His322Tyr	Missense	Heterozigose	VUS (PM2)	18.04/0.23
	GLI3	15	chr7-42005936	c.2735G>A	p.Ser912Asn	Missense	Heterozigose	LB (PM2, BP4, BP6)	19.62/0.13
P12	AR	4	chrX:66931469	c.2111G>A	p.Ser704Asn	Missense	Hemizigose	PP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	26.4/0.83
P13	-	-	-	-	-	-	-	-	
P14	-	-	-	-	-	-	-	-	
P15	-	-	-	-	-	-	-	-	
P16	-	-	-	-	-	-	-	-	
P17	HOXA1	1	chr7:27135139	c.393C>A	p.Tyr131*	Stop gain	Heterozigose	PP (PVS1, PM2)	
P18	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabela 7: Resumo das variantes candidatas identificadas pela técnica de sequenciamento de exoma. Paciente (PAC.), consequência (CONSEQ.), variante benigna (B), variante possivelmente benigna (LB), variante de significado incerto (VUS), variante patogênica (P), variante possivelmente patogênica (PP). Nenhuma variante relevante identificada (-).

## 10 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram encontradas alterações em 66,66% (12/18) das mulheres participantes. As variantes identificadas por sequenciamento de exoma foram: uma variante benigna, no gene *WT1*; uma variante possivelmente benigna, em *GLI3*; quatro VUS nos genes *ESR1*, *RET*, *WNT4* e *MAMLD1*; quatro variantes possivelmente patogênicas, nos genes em *SPEN*, *KYNU*, *AR* e *HOXA1*; uma variante patogênica em *CHD7* e duas variantes estruturais localizadas nos cromossomos 7 (Dup7q11.23) e 6 (Del6q14.3).

### 10.1 VARIANTES IDENTIFICADAS EM PACIENTES MRKH

#### 10.1.1 *WT1*:c.-8\_-7delIGC (NM\_001198551.1)

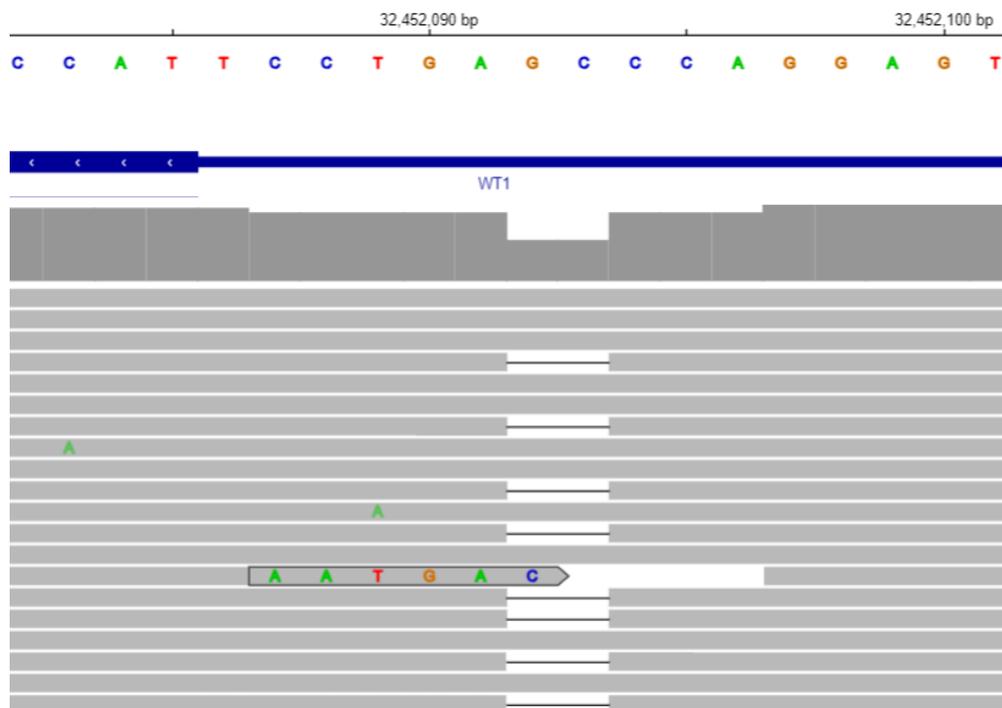
O sequenciamento de exoma revelou uma variante em *WT1* (11p13), gene constituído de 10 éxons e responsável pela codificação de diferentes isoformas de fatores de transcrição (GUNES; MAHMUTOGLU; AGARWAL, 2016). Além de atuar como um importante supressor tumoral, esse gene possui papel essencial durante o desenvolvimento embrionário e está associado ao desenvolvimento normal de rins e gônadas (MIYAMOTO et al., 2008).

*WT1* é um fator de transcrição do tipo *zinc finger* que pode atuar tanto como ativador quanto como repressor transcricional, sendo considerado um regulador essencial para o desenvolvimento urogenital. O gene *WT1* é expresso na gônada indiferenciada e atua juntamente com *SF1* no início do desenvolvimento urogenital. Mutações nesse gene podem dar origem a diferentes condições com um amplo espectro de malformações genitais, variando de genitália externa ambígua a disgenesia gonadal (OHNESORG; VILAIN; SINCLAIR, 2014; TORRES-CANO et al., 2022).

Dessa maneira, mutações em *WT1* são responsáveis por doenças que possuem acometimento urogenital, tais como: Síndrome de Denys-Drash,

caracterizada por tumor de Wilm's, síndrome nefrótica e genitália ambígua; e Síndrome de Frasier, que possui comprometimento renal e sexo reverso 46,XY (MIYAMOTO et al., 2008).

A variante, c.-8\_-7delGC, identificada em heterozigose na região 5' não traduzida (5' UTR), preenche quatro critérios benignos (BA1, BS2, BP6 e BP7), sendo classificada de acordo com os critérios ACMG como benigna (**Figura 15**).



**Figura 15.** Visualização da variante identificada no gene *WT1* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV).

Essa variante foi observada em quatro das 12 pacientes não relacionadas diagnosticadas com MRKH (P1, P5, P7 e P9). Além disso, a variante c.-8\_-7delGC apresenta uma frequência de 0.003960 no banco de dados gnomAD e de 0.0149 na população brasileira, de acordo com o banco de dados AbraOM. Os bancos de dados de frequência populacional agregam informações de ambos os sexos. Considerando que a MRKH é uma doença que acomete somente mulheres, a inclusão de dados de indivíduos do sexo masculino, que não são acometidos por essa condição, pode elevar a frequência populacional estabelecida.

Sabe-se que a região 5'UTR está envolvida em processos de regulação da expressão gênica, possuindo diversos sítios de ligação de proteínas que promovem ou reprimem a tradução. Alterações envolvendo essa região podem estar associadas ao desenvolvimento de doenças (CHATTERJEE; PAL, 2009). Dessa maneira, uma variante na região 5'UTR pode promover uma possível alteração de regulação gerando modificação a nível de expressão.

Um número crescente de estudos envolvendo análises de padrão de metilação vem sendo reportados na literatura, já que esse fenômeno epigenético também é capaz de influenciar na expressão gênica, porém sem alterar a sequência de bases do DNA. Grande parte das ilhas CpGs estão presentes em regiões regulatórias de genes, como as regiões promotoras. A metilação de sítios CpGs nessas regiões pode acarretar a inativação de determinado gene (LI, 2021).

Considerando que o estabelecimento da via de diferenciação feminina ou masculina depende da ativação e/ou repressão de diversos genes, os mecanismos epigenéticos se tornam importantes no processo de regulação da expressão gênica. (PIFERRER, 2013). Por ser essencial na diferenciação sexual, *WT1* assim como outros genes que participam desse processo, já foram sugeridos como genes candidatos para MRKH (MORCEL; CAMBORIEUX; GUERRIER, 2007). Essa hipótese é reforçada pelo resultado de estudos em animais demonstrando que camundongos *Wt1-null* não tiveram o desenvolvimento de rins, gônadas e adrenais (MIYAMOTO et al., 2008).

É importante ressaltar que a formação de ovários e testículos são essenciais para o correto desenvolvimento de características futuras, que são derivadas de fatores secretados pelas gônadas. Dessa maneira, um relevante estágio do processo de desenvolvimento, após a formação das gônadas, é a diferenciação dos ductos de Müller e ductos de Wolff (KLATTIG et al., 2007). Conforme abordado anteriormente, os ductos müllerianos são essenciais para formação de estruturas do sistema reprodutor feminino, como útero e porção superior do canal vaginal, que estão comprometidas em mulheres com MRKH (LEDIG; WIEACKER, 2018).

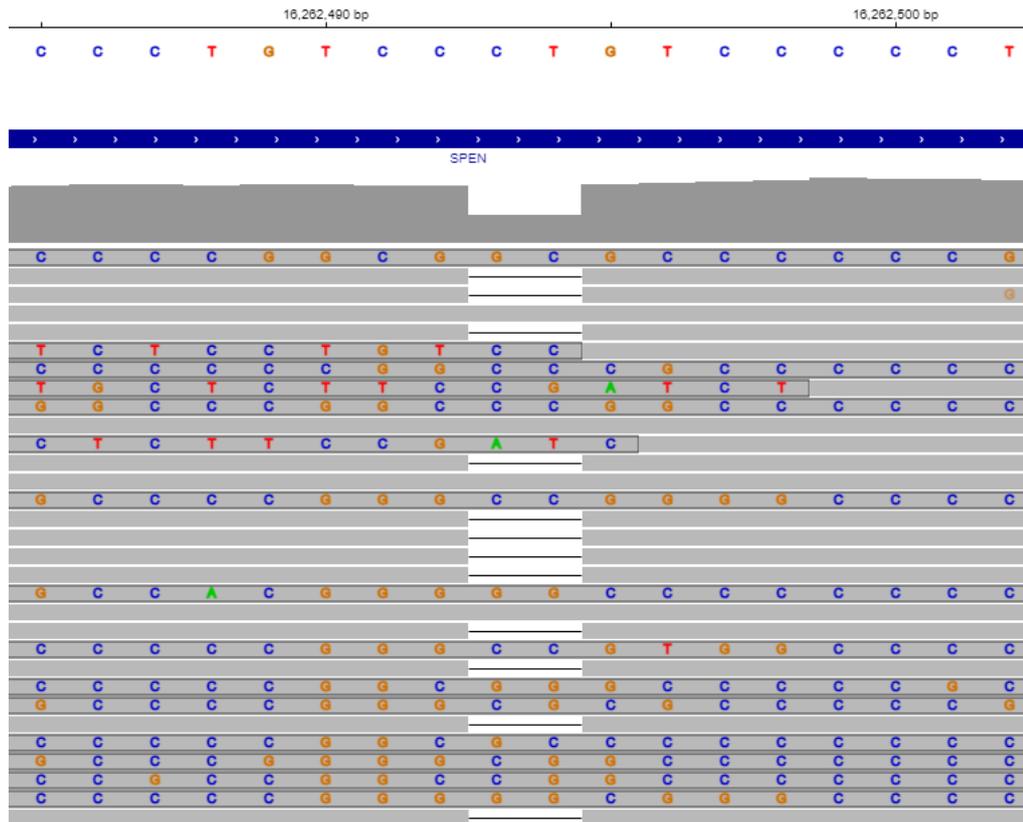
Em estudo conduzido por Rall et al (2011) foi observado que *WT1* e *GATA4* estavam hipometilados nas pacientes com MRKH, o que pode levar a ativação de *AMH* e regressão dos ductos de Müller. Tendo em vista as informações acima citadas, a utilização de metodologias para avaliar o padrão de metilação dos genes *WT1* e/ou

*GATA4* pode contribuir com o conhecimento acerca da etiologia genética da MRKH (SHY, 2016).

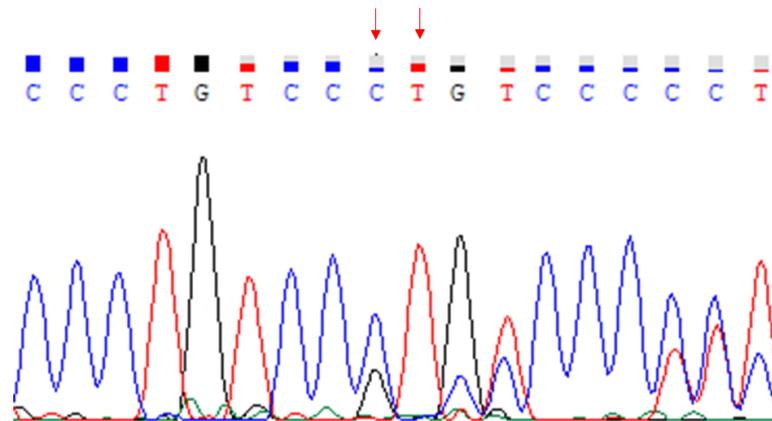
Portanto, a identificação da variante no gene *WT1* em quatro pacientes não relacionadas e diagnosticadas com MRKH, pode sugerir uma associação entre essa alteração genética e a manifestação clínica observada nessas mulheres. Contudo, para auxiliar na compreensão do impacto dessa variante na expressão do gene *WT1* são necessários estudos adicionais, como estudos funcionais, ensaios de metilação e expressão gênica. Essas abordagens podem fornecer informações sobre a relevância desse achado dentro do contexto da MRKH.

#### **10.1.2 *SPEN*:c.9758\_9759delCT (NM\_015001.3)**

Em associação ao quadro clínico de P2, o sequenciamento de exoma revelou uma variante em heterozigose no gene *SPEN* que leva a deleção de duas bases, alterando o quadro de leitura. A variante c.9758\_9759delCT, do tipo *frameshift*, preenche dois critérios de patogenicidade (PVS1 e PM2), sendo classificada segundo os critérios ACMG como possivelmente patogênica (**Figura 16**). A presença dessa variante em heterozigose foi confirmada na paciente por sequenciamento Sanger (**Figura 17**).



**Figura 16.** Visualização da variante identificada no gene *SPEN* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV). Apesar dos erros de alinhamento, foi observado em aproximadamente 50% dos alinhamentos corretos, a presença da variante c.9758\_9759delCT.



**Figura 17.** Sequenciamento Sanger do gene *SPEN*. Variante c.9758\_9759delCT em heterozigose (seta vermelha) confirmada por sequenciamento Sanger.

O gene *SPEN*, mapeado no cromossomo 1 (1p36.21-p36.13), é responsável pela codificação de uma proteína que, em sua região N-terminal, possui quatro motivos de reconhecimento ao RNA (RRMs) e, em sua extremidade C-terminal, possui

um domínio SPOC altamente conservado (ROBERT-FINESTRA et al., 2021). Esse gene possui função indispensável durante o desenvolvimento embrionário, regulando diferentes vias de sinalização celular, além de atuar como repressor transcricional (LÉGARÉ et al., 2015).

O gene *SPEN* é encontrado deletado em um grupo de pacientes com deleção proximal 1p36. A deleção 1p36 é uma condição, com heterogeneidade clínica e molecular, caracterizada pelo atraso no desenvolvimento/deficiência intelectual, alterações comportamentais, anomalias renais, baixa estatura, entre outros aspectos. A deleção 1p36 possui duas regiões consideradas críticas, uma proximal e outra distal, sendo que essas regiões estão associadas à dismorfias faciais distintas (RADIO et al., 2021). Como sugerido por Jordan; Zaveri; Scott, (2015), a haploinsuficiência de *SPEN* pode contribuir para o fenótipo da síndrome de deleção 1p36.

Adicionalmente, variantes em *SPEN* têm sido observadas em indivíduos com deficiência intelectual e transtorno do espectro autista. Em estudo conduzido por Wang e colaboradores (2020), todos os pacientes avaliados que possuíam comprometimento neurocomportamental apresentavam variantes deletórias em *SPEN*. Além disso, em estudo utilizando camundongo nocaute foi observado retardo de crescimento e hipoplasia cerebral, sugerindo que o gene *SPEN* participa da regulação da sobrevivência das células neuronais (YABE et al., 2007).

Variantes pontuais no gene *SPEN* foram associadas a uma forma sindrômica de desordem do neurodesenvolvimento, caracterizada por deficiência intelectual, anomalias congênitas múltiplas, dismorfias faciais, hipotonia e alterações de comportamento. Nesses indivíduos são identificadas características que se sobrepõem com fenótipo clínico associado a deleção proximal 1p36. Em adição, neste mesmo estudo, foi observado que a haploinsuficiência de *SPEN* não altera o perfil de metilação do genoma. Entretanto, foi identificada uma assinatura epigenética distinta no cromossomo X de mulheres afetadas, sugerindo uma contribuição para a regulação epigenética desse cromossomo (RADIO et al., 2021).

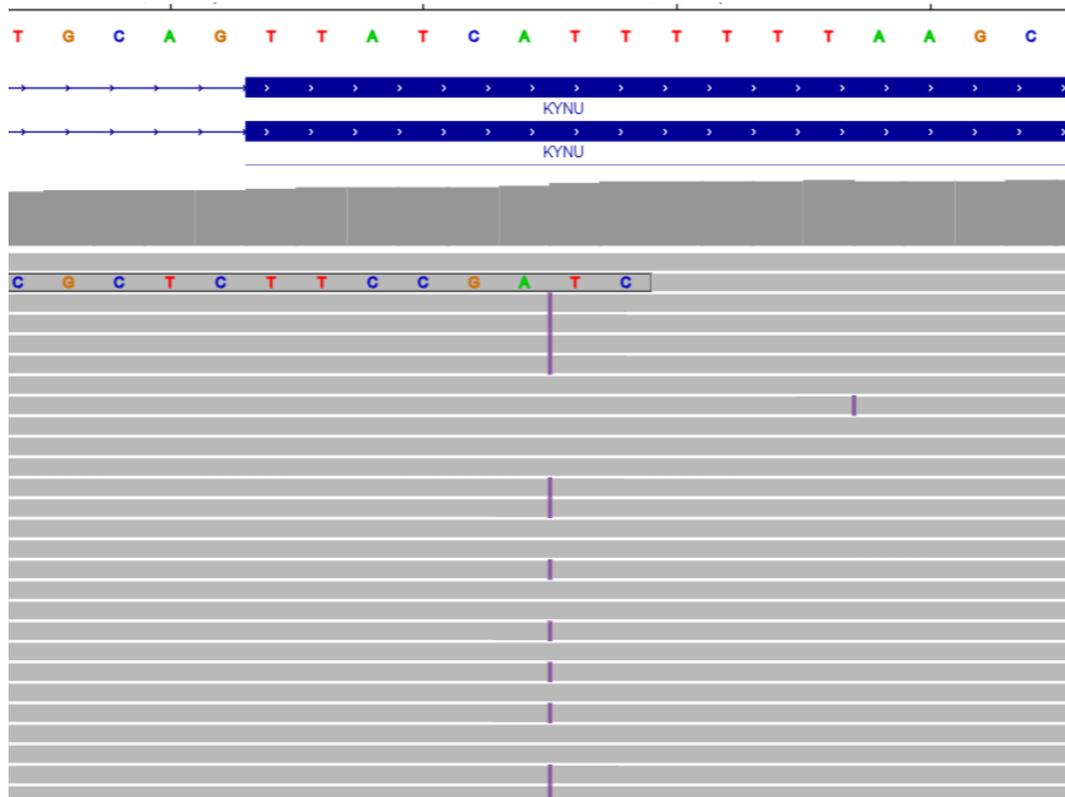
O gene *SPEN* também participa do remodelamento da cromatina e inativação do cromossomo X. Ele atua no silenciamento gênico ligado ao X por meio da interação entre o domínio RRM e a sequência repetitiva A do XIST (*X Inactive Specific Transcript*), e pela interação entre o domínio SPOC e correpressores (ROBERT-FINESTRA et al., 2021). Dessa maneira, o gene *SPEN* está envolvido no processo de compensação de dose entre XX e XY.

A paciente P2 possui anomalias do sistema reprodutor feminino que incluem agenesia uterovaginal. A correlação entre alterações müllerianas e variantes no gene *SPEN* não foram previamente descritas. No entanto, foi observado nessa paciente características faciais descritas em indivíduos com variantes truncadas no gene *SPEN*, como testa ampla, sobrancelhas arqueadas e alongadas, lábio superior fino, além de deficiência intelectual leve, aspecto também descrito nesse grupo de pacientes.

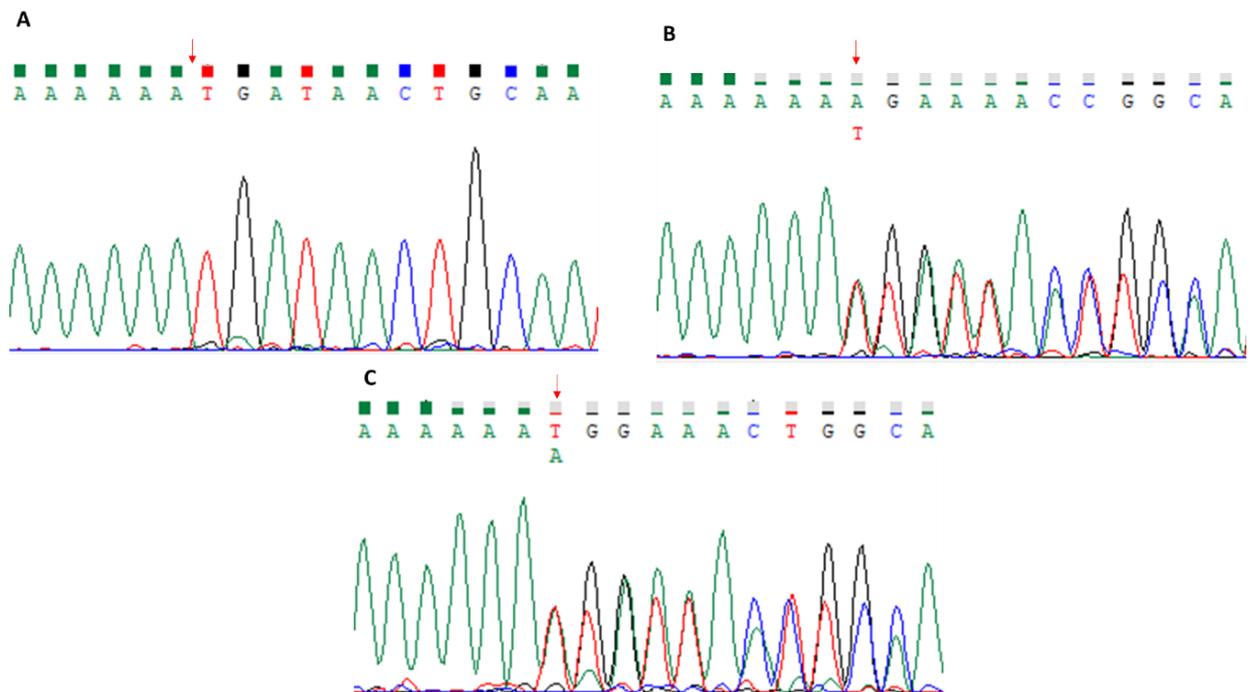
A variante c.9758\_9759delCT não foi identificada em bancos de dados como gnomAD e ClinVar, contudo, a perda de função nesse gene é um mecanismo conhecido de doença. Não há evidências suficientes na literatura que permitam confirmar que essa variante é a causa da malformação uterovaginal de P2, entretanto, essa alteração explica o quadro de deficiência intelectual e dismorfias observado na paciente.

### 10.1.3 *KYNU*:c.447dupT (NM\_003937.3)

O sequenciamento de exoma revelou, em uma única paciente participante do estudo (P6), uma variante em *KYNU*. Esse gene é composto por 14 éxons e está mapeado no braço longo do cromossomo 2 (2q22.2). A variante c.447dupT, do tipo *frameshift*, foi identificada em heterozigose. Essa alteração está mapeada no éxon 6 do gene e preenche dois critérios de patogenicidade (PVS1 e PM2), sendo classificada pelos critérios ACMG como possivelmente patogênica (**Figura 18**). Foi avaliada a presença dessa variante nos genitores de P6 por sequenciamento Sanger, sendo confirmada a origem paterna (**Figura 19**).



**Figura 18.** Visualização da variante identificada no gene *KYNU* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV).



**Figura 19.** Sequenciamento Sanger do gene *KYNU*. Variante c.447dupT ausente na amostra materna (A) e presente em heterozigose (seta vermelha) na paciente P6 (C) e em seu genitor (B).

O gene *KYNU* é expresso em diversos tecidos como fígado, bexiga e apêndice e está envolvido em diferentes tipos de câncer, em doenças inflamatórias e cardiovasculares. Esse gene é responsável pela codificação da quinureninase, uma enzima que atua na via da quinurenina, principal rota do metabolismo do triptofano, contribuindo com a biossíntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) (AL-MANSOOB et al., 2021).

O NAD<sup>+</sup> é importante em diversos mecanismos celulares, incluindo interações proteína-proteína, processos epigenéticos, função mitocondrial, reparo do DNA, divisão celular, resposta imune e inflamação (SCHÜLE et al., 2021). A insuficiência na síntese de NAD<sup>+</sup> durante o desenvolvimento embrionário pode resultar em malformações congênitas, que atingem frequentemente o coração, rins e membros, e estão associadas a variantes nos genes *HAAO*, *KYNU* e *NADSYN1* (SZOT et al., 2021).

Variantes patogênicas em homozigose ou heterozigose composta nos genes *KYNU* e *HAAO* foram descritas por Shi e colaboradores (2017), estando associadas a Síndrome VCRL (do inglês, *Vertebral, Cardiac, Renal and Limb Defect Syndrome*). Essa condição possui herança autossômica recessiva e tem como malformações frequentes as anomalias vertebrais, defeitos cardíacos congênitos, alterações renais e de membros. Todavia, os indivíduos afetados também podem apresentar malformações adicionais que incluem microcefalia, baixa estatura, implantação baixa das orelhas, perda auditiva e atraso do desenvolvimento.

Variantes em *KYNU* que resultam em perda de função, provocam o acúmulo dos metabólitos localizados próximo ao bloqueio enzimático, resultando em níveis elevados de ácido xanturênico. Esse cenário também promove redução dos metabólitos *downstream*, incluindo a diminuição dos níveis de NAD<sup>+</sup>. Sendo assim, bloqueios menos severos na degradação do triptofano resultam apenas em acidúria xanturêmica, enquanto bloqueios mais intensos estão associados a malformações congênitas (EHMKE et al., 2020). A ampla variedade de processos biológicos que NAD<sup>+</sup> participa, explica o acometimento de múltiplos sistemas associados a variantes com perda de função no gene *KYNU* (SCHÜLE et al., 2021).

Na literatura, os relatos de variantes nesse gene são escassos, contudo, quando presentes, são frequentemente acompanhados de fenótipos cardíacos que incluem coração esquerdo hipoplásico, defeito de septo ventricular e atrial, entre outros. Também foram documentadas alterações renais como hipoplasia e agenesia

renal unilateral, além de alterações esqueléticas como defeitos de segmentação vertebral (EHMKE et al., 2020; SCHÜLE et al., 2021; SHI et al., 2017). Em contrapartida, o relato de uma variante *missense* em homozigose, resultando na substituição de aminoácido, foi reportada anteriormente em dois irmãos sem malformações congênitas (CHRISTENSEN et al., 2007).

P6 possui um quadro de anomalias müllerianas acompanhada de malformações adicionais que incluem: rim pélvico, agenesia renal unilateral, vértebra de transição com megapófise transversa e perda auditiva em altas frequências, o que nos levou a classificar P6 como MURCS. Em adição, essa paciente possui comprometimento no sistema renal e esquelético, que são sistemas frequentemente alterados em pacientes com VCRL.

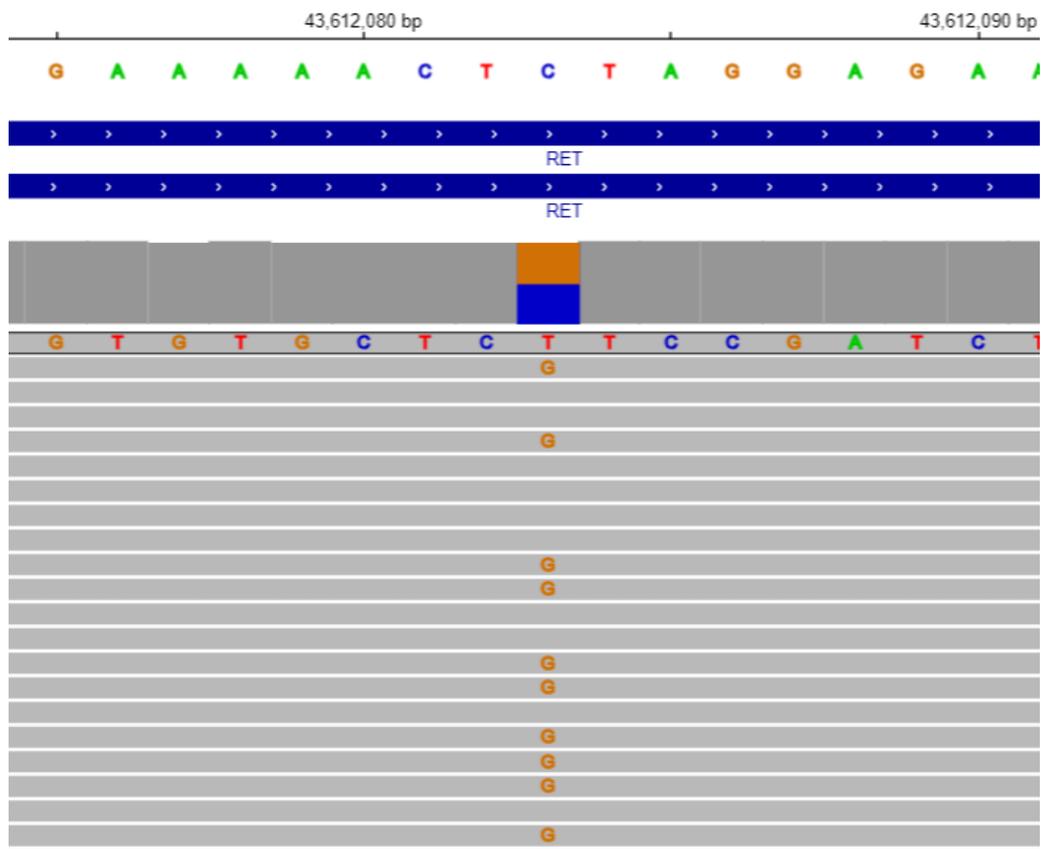
Não foi identificado na literatura relação entre variantes em *KYNU* e alterações müllerianas, exceto pela hipótese levantada por Mark (2022), onde sugere a deficiência de NAD<sup>+</sup> como um mecanismo para a formação de múltiplas malformações, entre elas MURCS e VACTERL. Dessa forma, o autor acredita que essas malformações congênitas não devem ser consideradas entidades distintas e sim parte de uma mesma ampla entidade. Entretanto, não foram realizados estudos experimentais.

Variantes patogênicas/possivelmente patogênicas do tipo *frameshift* já foram reportadas no ClinVar. A variante identificada em P6 está presente em heterozigose, o que diverge dos dados observados na literatura para VCRL, onde indivíduos afetados são homozigotos ou heterozigotos compostos. Dessa maneira, é pouco provável que a variante c.447dupT, herdada do pai normal, prejudique a síntese de NAD<sup>+</sup> na paciente avaliada, sendo também pouco provável sua relação com a MRKH. No entanto, a avaliação da atividade enzimática de *KYNU*, pode auxiliar na compreensão do impacto da variante c.447dupT no organismo.

#### **10.1.4 RET:c.2188C>G (NM\_020975.6)**

O sequenciamento de exoma revelou uma variante no gene *RET* na paciente P6, mesma paciente onde foi identificada a variante *KYNU*:c.447dupT. A variante *missense*, *RET*:c.2188C>G, identificada em heterozigose, se localiza no éxon 12 do

gene causando troca de uma citosina por guanina, o que acarreta a substituição do aminoácido leucina por valina. As ferramentas de predição *in silico* como *Mutation Taster*, *GenoCanyon* e *Revel* avaliaram a variante presente em P6 como deletéria. Essa variante preenche dois critérios de patogenicidade (PM2 e PP3), sendo classificada de acordo com os critérios ACMG como VUS (**Figura 20**). Os genitores da paciente P6 ainda não foram testados para essa variante.



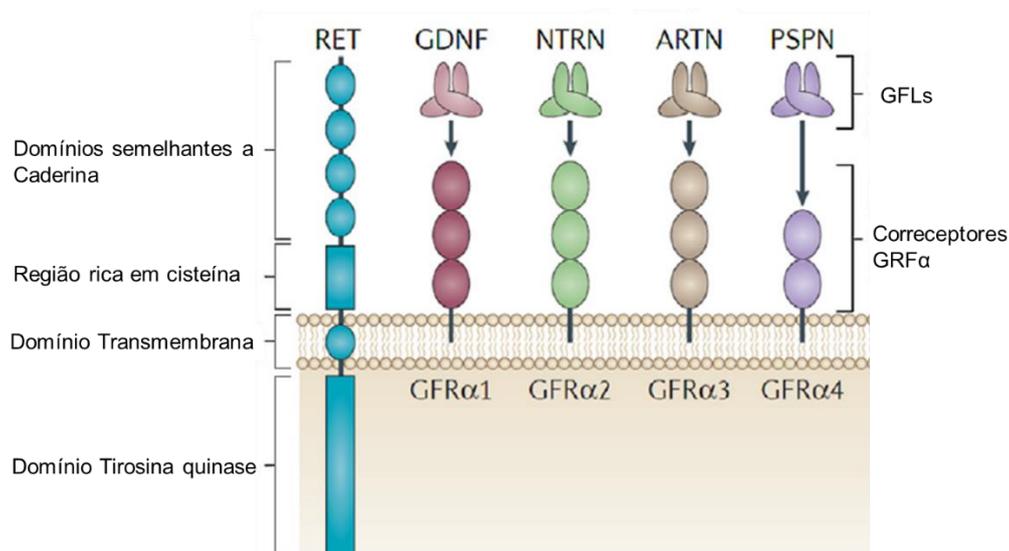
**Figura 20.** Visualização da variante identificada no gene *RET* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV).

O gene *RET*, mapeado no cromossomo 10q11.2, é composto por 21 éxons. Esse gene é responsável pela codificação de um receptor transmembrana da família tirosina quinase, sendo considerado importante para o correto desenvolvimento dos rins e trato urinário. Devido a ampla expressão desse receptor, variantes localizadas no gene *RET* estão relacionadas a uma variedade de doenças como anomalias congênitas do rim e trato urinário (CAKUT), doença de Hirschsprung (caracterizada

por obstrução intestinal), e câncer (DOSS et al., 2014; WOOD; ELSE; SAMPSON, 2019).

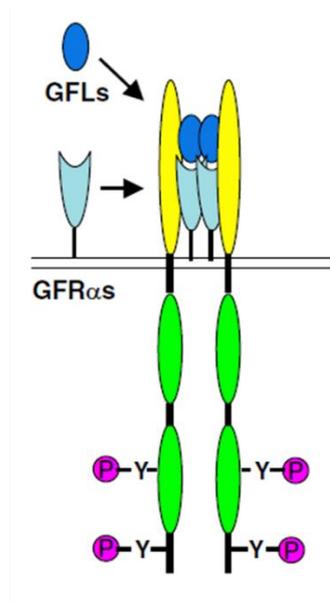
A proteína RET é um receptor transmembrana composto por um domínio extracelular de ligação (resíduos 29-635), que inclui quatro domínios semelhantes a caderina e uma região rica em cisteína. Além disso, esse receptor possui um domínio transmembrana hidrofóbico (resíduos 636-657) e um domínio intracelular com dois sítios tirosina quinase (resíduos 658-1114) (ARIGHI; BORRELLO; SARIOLA, 2005; DOSS et al., 2014; KOUVARAKI et al., 2005).

Sabe-se que, em condições normais, esse receptor é ativado por ligantes pertencentes a família GDNF (*Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor*), são eles: GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN), e perfesina (PSPN) (**Figura 21**). Para que seja estabelecida a ligação entre os ligantes da família GDNF (GFL) e o domínio extracelular de RET, é necessária a presença do correceptor  $GFR\alpha$  (*GDNF-family receptor- $\alpha$* ), promovendo a formação do complexo RET-GFL- $GFR\alpha$  e, conseqüente, ativação do receptor (PLAZA-MENACHO, 2018).



**Figura 21.** Estrutura do receptor RET e seus ligantes. O receptor RET é constituído por um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular. Os ligantes da família GDNF (GFL) participam da ativação do receptor se ligando preferencialmente a um correceptor específico ( $GFR\alpha$ 1-4). Fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF), neurtrina (NRTN), artemina (ARTN), perfisina (PSPN). Fonte: Adaptada de Roskoski; Sadeghi-Nejad, 2018.

Existem quatro correceptores  $GFR\alpha$ , sendo que cada GFL se liga preferencialmente a um correceptor específico (KAWAI; TAKAHASHI, 2020). A ativação de RET induz uma cascata de eventos como a dimerização e, em seguida, autofosforilação de resíduos específicos de tirosina presentes no domínio intracelular (**Figura 22**). O fosfato necessário para as reações de fosforilação, é proveniente do ATP. Dessa maneira, a proteína quinase realiza a transferência do fosfato para um resíduo específico de tirosina (BIONDI; NEBREDA, 2003). Esse processo permite o desencadeamento de diferentes vias de transdução de sinal (ARIGHI; BORRELLO; SARIOLA, 2005; KNOWLES et al., 2006; MURAKUMO et al., 2006).

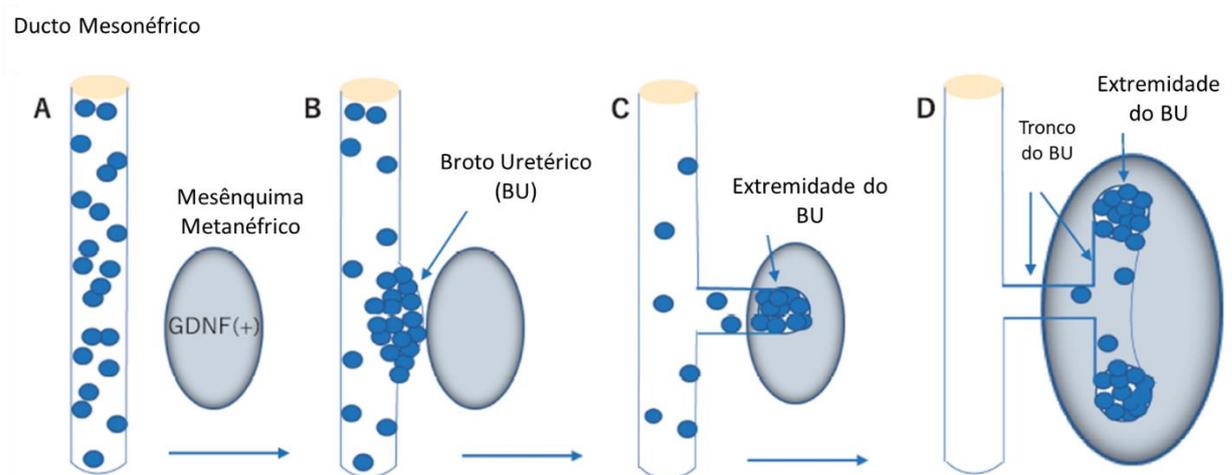


**Figura 22.** Mecanismo de ativação do receptor RET. Os ligantes da família GDNF (GFL) se ligam ao correceptor  $GFR\alpha$  ( $GFR\alpha 1-4$ ), promovendo a formação do complexo RET-GFL- $GFR\alpha$ . A formação do complexo induz a dimerização e a fosforilação (P) de resíduos de tirosina (Y). Fonte: Adaptado de Murakumo et al., 2006.

A via de sinalização RET/GDNF possui papel fundamental para o desenvolvimento renal. Durante o período embrionário, o ducto mesonéfrico sofre evaginação da sua porção caudal dando origem ao broto uretérico. Tanto o receptor RET quanto o correceptor  $GFR\alpha 1$  são expressos ao longo dos ductos mesonéfricos. Por outro lado, o GDNF é expresso no mesênquima metanéfrico, que se configura uma região específica do mesoderma intermediário que possui função importante no

controle do desenvolvimento do broto uretérico (**Figura 23**) (COSTANTINI; SHAKYA, 2006).

Posteriormente, o broto uretérico invagina o mesênquima metanéfrico e se ramifica. Acredita-se que durante o período do desenvolvimento embrionário, as extremidades do broto uretérico são formadas por células que expressam RET e que respondem ao GDNF no mesênquima metanéfrico. Em contrapartida, o tronco do broto uretérico é composto em sua maioria por células que não expressam RET (TAKAHASHI, 2022). Dessa maneira, a ausência de RET resulta em falha no desenvolvimento do broto uretérico, desencadeando fenótipos de agenesia/aplasia renal (CHATTERJEE et al., 2013; TAKAHASHI, 2022).



**Figura 23.** Desenvolvimento do Broto Uretérico (BU). **(A)** Durante o desenvolvimento renal RET é expresso ao longo do Ducto Mesonéfrico (representado em esferas azuis) e o GDNF é expresso no mesênquima metanéfrico. **(B)** Migração das células que expressam RET para a formação do BU. **(C)** Crescimento do BU, indicando a expressão de RET restrita a extremidade do BU. **(D)** Células que não expressam RET formam o tronco. Fonte: Adaptada de Takahashi, 2022.

Em estudo conduzido por Skinner e colaboradores (2008), 33 fetos natimortos com agenesia/displasia renal foram avaliados, sendo observada alta ocorrência de variantes *RET* no grupo avaliado. Foram encontradas variantes em 7/19 fetos com agenesia renal bilateral e em 2/10 fetos com agenesia renal unilateral. Autores concluem que mutações em heterozigose em *RET* podem ser responsáveis por uma parcela significativa dos casos em que ocorre desenvolvimento anormal dos rins.

Além disso, alteração em heterozigose no gene *RET* (p.S811F) que atinge o éxon 14 foi descrita por Sugimoto e colaboradores (2016) em um paciente com aganglionose colônica total, agenesia renal unilateral e oligomeganeftonia. No ano seguinte, em outro estudo, foi relatado um indivíduo com quadro de agenesia renal unilateral portador de variante em heterozigose composta em *RET* (WU et al., 2017).

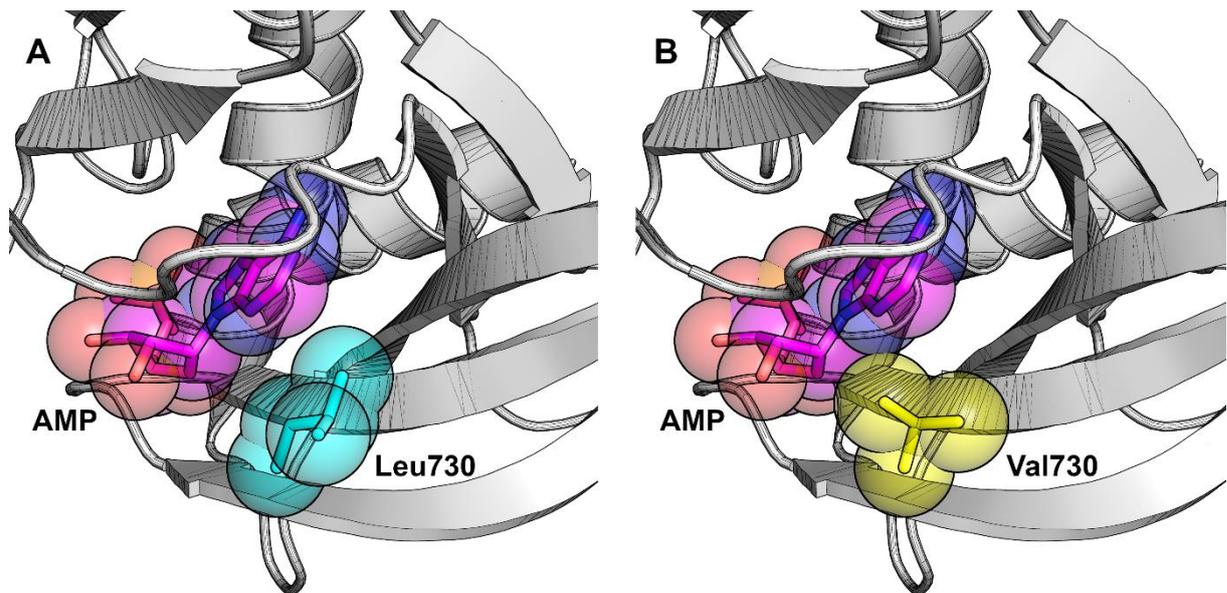
Contudo, a análise de 105 fetos com alterações renais bilaterais, observou baixa frequência de alterações em *RET* (<7%). Sugerindo que variantes nesse gene podem não ser um mecanismo importante diante desses quadros de malformações renais (JEANPIERRE et al., 2011). Em adição, avaliação de 122 pacientes portadores de CAKUT, identificou variantes em *RET* ou *GDNF* em 6 pacientes não relacionados (5%) (CHATTERJEE et al., 2013).

Variantes em heterozigose no gene *RET* que resultam em perda de função são frequentemente reportadas em casos de doença de Hirschsprung. Além disso, variantes que levam a uma função reduzida ou à perda total de função, estão associadas também a malformações renais como agenesia renal e displasia (JEANPIERRE et al., 2011; WOOD; ELSE; SAMPSON, 2019).

Anteriormente, Sakai et al. (1998) descreveram um caso de doença de Hirschsprung e Síndrome de Hipoventilação Central Congênita, no qual não foram relatadas malformações renais. No entanto, foi identificada uma variante *missense* (Thr706Ala) em heterozigose que atinge o éxon 12, mesmo éxon afetado na paciente P6 do presente estudo.

A análise da conformação estrutural da proteína *RET wild type*, ilustrada na **Figura 24A**, demonstra a ligação do receptor ao AMP. Embora a estrutura cristalográfica de *RET-ATP* não esteja disponível em bancos de dados, Knowles et al. (2006) determinaram a estrutura do ligante AMP ao receptor *RET* (PDB:2IVT), demonstrando que o AMP se liga de maneira similar ao ATP.

Conforme observado na **Figura 24B**, a substituição de leucina por valina na posição 730 promove um choque estérico com o ligante AMP. Dessa maneira, a variante L730V, identificada na paciente descrita neste trabalho, pode comprometer a ligação do ATP ao seu sítio de ligação e influenciar na fosforilação e consequentemente na ativação do receptor, ou influenciar a fosforilação de outros fatores celulares pelo receptor.



**Figura 24.** Representação da proteína RET-AMP. Proteína RET ilustrada em branco e o ligante AMP em magenta. **(A)** Proteína RET selvagem com Leu730 em ciano. Não é observado choque entre as moléculas. **(B)** Proteína RET com a variante Val730 em amarelo. É observado choque estérico.

Em síntese, P6 possui um quadro de malformações que acometem diversos sistemas, incluindo o sistema renal, com presença de agenesia renal unilateral e rim pélvico. É importante destacar que a variante identificada em P6 foi reportada anteriormente na literatura em estudo de resistência adquirida a drogas, devido a mutações secundárias no domínio tirosina quinase (LIU et al., 2018).

Embora a variante c.2188C>G, identificada no presente trabalho, conste no Clinvar, ela está ausente no banco de dados de frequência populacional, gnomAD. Diante do exposto, é possível que a variante observada em P6 seja responsável pelas alterações renais observadas na paciente. Entretanto, são necessários mais estudos para determinar o papel dessa variante no organismo.

### 10.1.5 Del 6q14.3

Além das variantes nos genes *KYNU* e *RET* na paciente P6, o sequenciamento de exoma também revelou a presença de uma deleção de 1.1Mb que acomete o

segmento 6q14.3. Essa alteração foi previamente observada em nosso estudo anterior por meio da técnica de CMA.

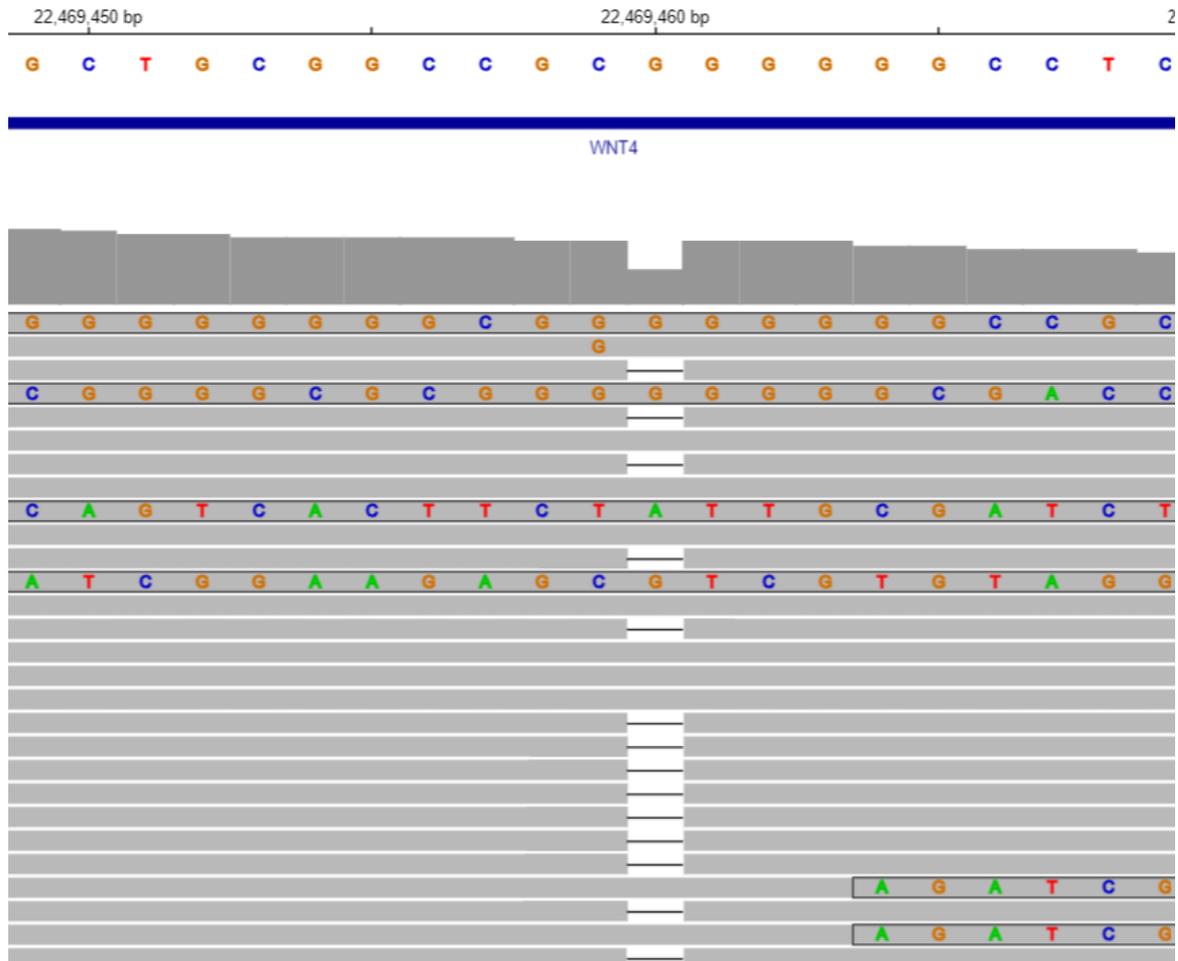
A deleção 6q14.3 envolve apenas um único gene (*HTR1E*), membro da família de receptores de serotonina. Esse gene é expresso no córtex frontal, hipocampo e bulbo olfatório (KLEIN et al., 2011; MCALLISTER et al., 1992). Embora sua função específica não seja totalmente esclarecida, acredita-se que o gene *HTR1E* atue em aspectos relacionados a memória e aprendizagem (SHARMA et al., 2023).

O papel desse gene também foi investigado em estudo recente conduzido por Qin et al., (2021). Considerando que o estresse psicológico já foi associado ao desenvolvimento de câncer, estes autores utilizaram células de câncer de ovário e observaram que *HTR1E* pode ser capaz de prevenir o progresso, promovido pelo estresse, nesse tipo de câncer.

Utilizando o CMA como ferramenta de investigação, identificou-se a presença de microdeleção 6q14.3 no pai normal da paciente P6. Em adição, não foi identificado na literatura estudos que demonstrem correlação entre gene *HTR1E* e a ocorrência de MRKH, sendo também improvável sua associação à patogênese da doença.

#### 10.1.6 *WNT4*:c.-45delC (NM\_030761.5)

O sequenciamento de exoma revelou uma variante em *WNT4* na paciente P7. Nessa mesma paciente também foi identificada outra variante em *WT1* (c.-8\_7delGC). O gene *WNT4* está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p36.12) e é constituído de 5 éxons. A variante c.-45delC, identificada em heterozigose na região 5'UTR preenche um critério de patogenicidade (PM2) e um único critério benigno (BP7), sendo classificada pelos critérios ACMG como VUS (**Figura 25**).



**Figura 25.** Visualização da variante identificada no gene *WNT4* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV). Observa-se erros de alinhamento, porém aproximadamente 50% dos alinhamentos corretos apresentam a variante *WNT4:c.-45delC*.

O gene *WNT4* pertence à família de moléculas sinalizadoras WNT, que é essencial em diversas vias de sinalização durante o desenvolvimento embrionário. Sabe-se que *WNT4* é expresso na gônada bipotencial e está envolvido tanto no processo de desenvolvimento do sistema reprodutor feminino quanto na repressão da formação testicular (CHEN et al., 2011; FONTANA et al., 2017; TRIANTAFYLLIDI et al., 2022).

Esse gene é responsável pela codificação de uma proteína de sinalização extracelular que participa da regulação de diversos processos tais como: interações célula-célula, proliferação, diferenciação, migração e ativação gênica, estando envolvido no desenvolvimento dos rins, adrenal e gônadas. As proteínas WNT exercem sua função através de sua ligação aos receptores transmembrânicos *frizzled*

e podem participar da regulação de eventos celulares através da via de sinalização canônica (WNT/ $\beta$ -catenina) e não canônica (DRUMMOND, 2007; YU et al., 2009).

Estudos utilizando modelo animal observaram que os camundongos nocautes (*Wnt4*<sup>-/-</sup>) apresentaram comprometimento renal em ambos os sexos. Por outro lado, foi identificado somente nas fêmeas nocautes, ausência dos ductos müllerianos, persistência dos ductos de Wolff, aparência masculinizada, alteração no desenvolvimento gonadal e na função esteroidogênica (LAYMAN, 2014).

Apesar da etiologia da MRKH ainda ser amplamente desconhecida, variantes em *WNT4* foram confirmadas em um número pequeno de indivíduos. Mutações nesse gene foram consideradas causais em mulheres com MRKH associada a hiperandrogenismo, contudo essa condição é considerada uma entidade distinta da MRKH (HERLIN et al., 2019). Em 2004, Biason-Lauber e colaboradores reportaram a presença de uma variante do tipo *missense* no éxon 5 do gene *WNT4*. Essa variante foi identificada em uma mulher de 18 anos de idade com agenesia útero-vaginal e níveis de testosterona levemente acima da faixa considerada normal. Posteriormente, relatos semelhantes em outras pacientes com variante em heterozigose em *WNT4* também foram descritas (BIASON-LAUBER et al., 2007; PHILIBERT et al., 2008).

Mais recentemente Ragitha e colaboradores (2023) avaliaram o gene *WNT4* em 32 pacientes indianas com agenesia mülleriana e/ou disgenesia gonadal. Dentre as alterações encontradas, foi identificado um polimorfismo sinônimo que atinge o éxon 5, em uma paciente com agenesia uterina e vagina em fundo cego; também foi identificado em dois casos, variantes intrônicas. Uma delas em uma paciente com agenesia uterina e vagina em fundo cego e a outra em uma paciente com útero infantil e ausência de ovários. Entretanto, variantes intrônicas no gene *WNT4* são raramente reportadas em doenças. Dessa maneira, os autores não estabeleceram uma relação entre essas variantes e o fenótipo clínico apresentado pelas pacientes. Outras variantes *missense* atingindo o éxon 5 do gene *WNT4* também foram reportadas, contudo ainda são necessárias análises *in vitro* para estabelecer seu efeito (MIKHAEL et al., 2021).

A variante identificada em P7 está localizada na região 5'UTR do gene *WNT4*, não sendo identificada no Clinvar e com frequência de 0.00004689 no gnomAD. Embora mutações nesse gene já terem sido previamente descritas em mulheres com MRKH e hiperandrogenismo, não foram encontrados na literatura relatos de variantes localizadas nessa região. Em adição, devido a descontinuidade de P7 aos

atendimentos oferecidos no ambulatório de genética, não foi possível a avaliação dos níveis hormonais da paciente.

Como abordando anteriormente neste trabalho, a região 5'UTR é importante nos processos de regulação da expressão gênica. Dessa maneira, alterações nessa região podem ser capazes de modificar a expressão do gene. Em adição, estudos epigenéticos também podem auxiliar na elucidação do impacto das variantes presentes nessa região, já que grande parte das ilhas CpGs estão localizadas em regiões regulatórias. Além disso, a região promotora de *WNT4* não apresenta TATA box e CCAAT box mas, sim, regiões ricas em GC e ilhas CpGs. Estes achados sugerem que mecanismos como metilação do DNA e remodelação da cromatina podem ser essenciais para a transcrição gênica de *WNT4* (YU et al., 2009).

Dessa maneira, mais estudos são necessários a fim de caracterizar de forma mais aprofundada o gene *WNT4* assim como sua região promotora em pacientes MRKH. A utilização de uma abordagem epigenética poderá contribuir para a correlação entre a variante neste gene e as alterações observadas.

### **10.1.7 Dup 7q11.23**

Na paciente P8, o sequenciamento de exoma revelou a presença de uma duplicação de 1.4Mb que acomete o segmento 7q11.23. Essa alteração foi previamente observada em nosso estudo anterior por meio da utilização da técnica de CMA. A duplicação dessa região está envolvida na Síndrome de microduplicação 7q11.23, descrita por Somerville e colaboradores (2005). O sequenciamento de exoma foi realizado para excluir outras possíveis alterações que pudessem explicar o quadro clínico da paciente.

Sabe-se que a deleção dessa mesma região é responsável pela ocorrência da Síndrome de Williams-Beuren (SWB). Esta condição é caracterizada por um padrão de herança autossômico dominante, no qual os indivíduos afetados apresentam uma deleção de aproximadamente 1.55-1.83Mb no cromossomo 7 (7q11.23) abrangendo 25-27 genes (KOZEL et al., 2021). A região crítica da SWB possui repetições com baixo número de cópias, do inglês *Low Copy Repeats* (LCRs), que são organizadas em blocos e possuem alta similaridade. A elevada homologia entre essas repetições

pode levar ao desalinhamento durante a meiose, favorecendo o *crossing over* desigual e deleção da região associada SWB. Dessa maneira, acredita-se que a duplicação do segmento cromossômico 7q11.23, seja decorrente do mesmo mecanismo (GHAFARI et al., 2018).

A Síndrome de microduplicação 7q11.23 possui uma incidência estimada de 1/7500 a 20000 indivíduos. Entre as características que são frequentemente relatadas podemos citar atraso no desenvolvimento da fala, dificuldades de aprendizado, função cognitiva variável (normal a deficiência intelectual). Alterações renais e cardíacas também podem ser identificadas nestes pacientes. O fenótipo facial inclui testa ampla, macrocefalia, filtro curto, lábio superior fino, nariz largo com implantação alta, sobrancelhas retas e baixa implantação de orelhas (MORRIS et al., 2015; PATIL et al., 2015).

Defeitos cardíacos congênitos possuem frequência relativamente baixa. No entanto, segundo Parrott e colaboradores (2015) é recomendado a vigilância cardíaca em pacientes com microduplicação 7q11.23, visto que todos os 9 pacientes avaliados no estudo apresentavam dilatação de aorta. Apesar da paciente P8 possuir duplicação de tamanho típico, é importante ressaltar a ausência de alterações renais e cardíacas, bem com função cognitiva preservada. Além disso, P8 exibe características fenotípicas previamente descritas em pacientes com microduplicação 7q11.23, como macrocefalia, nariz largo e anomalias de orelha.

Utilizando o MLPA como ferramenta de investigação, identificou-se a presença da microduplicação 7q11.23 na mãe da paciente. De fato, essa alteração foi reportada como herdada em estudos prévios (DIXIT et al., 2013). As alterações uterovaginais observadas em P8 não estão presentes em sua genitora, no entanto, ela apresenta outras características fenotípicas semelhantes a probanda.

Além das dismorfias faciais, P8 apresenta corno uterino, canal vaginal curto, ovários funcionais, escoliose e osteofitose. Morris e colaboradores (2015) descreveram dois pacientes com microduplicação 7q11.23 que apresentavam malformações entre elas, alteração mülleriana. O primeiro caso é um feto do sexo feminino, que apresentava, além da duplicação 7q uma deleção Xq28 de 10kb. Foi identificado neste feto de 40 semanas agenesia renal unilateral, agenesia mülleriana e presença de 11 costelas. No segundo caso foi identificado ventriculomegalia, agenesia renal esquerda e útero didelfo em feto do sexo feminino com 39 semanas

de gestação. Esses casos possuem alterações müllerianas que se assemelham ao quadro observado em P8 (MORRIS et al., 2015).

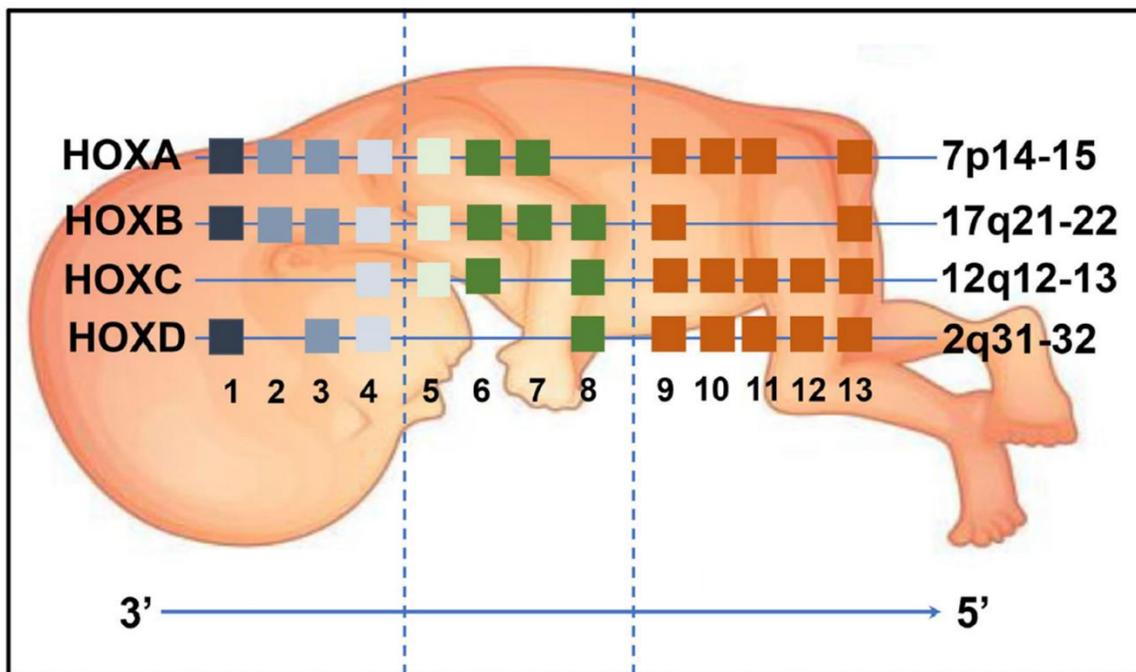
Zarate et al., (2014) descreveram cinco pacientes portadores da microduplicação 7q11.23 de tamanhos diversos. Um paciente de sexo masculino apresentava, entre outras características, alterações geniturinárias incluindo agenesia renal unilateral e agenesia gonadal esquerda. A mãe desse paciente, portadora de uma duplicação de 212 kb, exibia agenesia renal esquerda, agenesia ovariana esquerda e da tuba uterina esquerda. O paciente herdou a duplicação de 212 kb de sua mãe e possui uma segunda duplicação de 1.8 Mb. Os autores sugerem a realização de avaliações cardíacas e renais em pacientes com microduplicação.

A paciente P8 possuem alterações genitais compatíveis com o diagnóstico de MRKH. Além disso, seu fenótipo facial assemelha-se ao observado em pacientes com a microduplicação 7q11.23. Nossos resultados sugerem que a aplasia uterovaginal pode estar associada ao loci responsável pela síndrome de microduplicação 7q e ser considerado como região candidata para MRKH. A aplasia uterovaginal pode ser uma característica adicional dentro do amplo espectro do fenótipo dup7q e os pacientes diagnosticados com esta condição devem ser avaliados quanto a malformações genitais. No entanto, os genes potencialmente associados a alterações müllerianas nesta região ainda precisam ser determinados.

#### **10.1.8 HOXA1:c.393C>A (NM\_005522.4)**

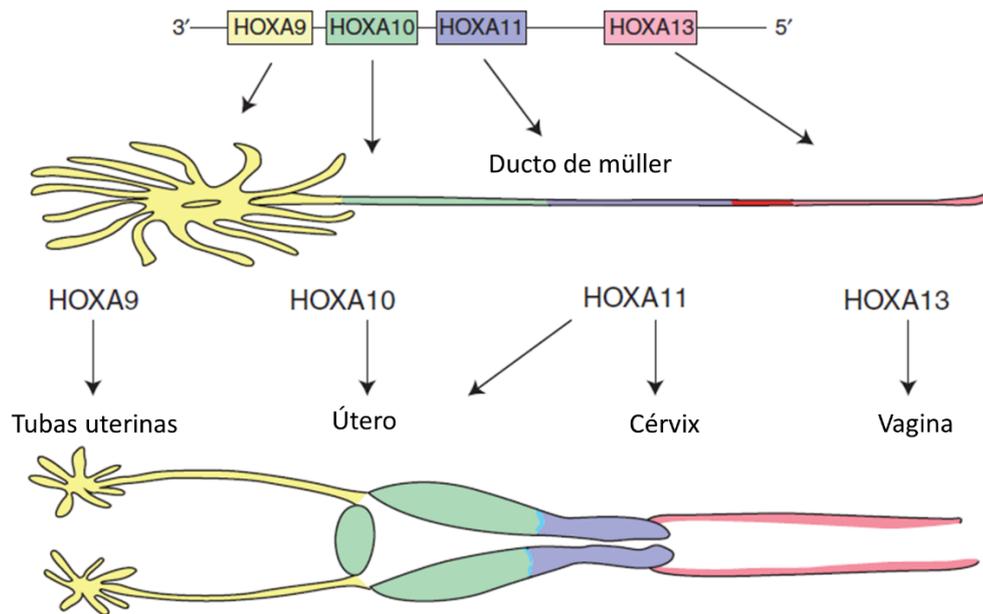
Em uma única paciente (P17), o sequenciamento de exoma revelou uma variante em heterozigose no gene *HOXA1*. A variante c.393C>A, *stop gain*, preenche dois critérios de patogenicidade (PVS1 e PM2), sendo classificada segundo os critérios ACMG como possivelmente patogênica. As ferramentas de predição *in silico* *Mutation Taster*, *GenoCanyon* e *FitCons* classificaram a variante como deletéria (**Figura 26**).





**Figura 27.** Organização dos genes *HOX*. Os 39 genes são organizados em quatro *clusters* (A, B, C e D). A organização espacial desses genes no cromossomo reflete diretamente a sequência temporal de sua ativação, sendo que os genes localizados na extremidade 3' são os primeiros a serem expressos em comparação com aqueles situados na posição 5'. Fonte: Adaptada de Wang et al., 2024.

De fato, os genes *HOX* foram investigados previamente em pacientes com MRKH devido a sua influência no desenvolvimento do trato urogenital, porém não foram identificadas alterações nas regiões codantes dos genes selecionados por Burel e colaboradores (2006). Como ilustrado na **Figura 28**, *Hoxa9* a *Hoxa13* desempenham papel na diferenciação dos ductos de Müller. *Hoxa9* é expresso em regiões que darão origem as tubas uterinas; *Hoxa10* está envolvido no desenvolvimento do útero; *Hoxa11* desempenha papel no segmento inferior do útero e cérvix; e *Hoxa13* é expresso no ectocérvix e porção superior da vagina (DU; TAYLOR, 2016). Em adição, *Hoxa11* e *Hoxa13* são importantes para o desenvolvimento renal, enquanto *Hoxa10* e *Hoxa11* atuam no desenvolvimento esquelético. Alterações nesses sistemas também podem ser observadas em pacientes com MRKH (GUERRIER et al., 2006; SULTAN; BIASON-LAUBER; PHILIBERT, 2009).



**Figura 28.** Genes *HOX* no desenvolvimento das estruturas derivadas dos ductos de Müller. Fonte: Adaptado de Du; Taylor, 2016.

Variante no gene *HOXA10* foi relatada em paciente com MRKH, porém com resultados incertos acerca da relação causal (CHEN et al., 2021). Além disso, o estudo conduzido por Rall et al. (2011) observou 293 genes diferencialmente expressos. Entre eles, *HOXA5* e *HOXA9* apresentaram superexpressão e hipometilação de seus sítios CpGs no tecido uterino de mulheres com MRKH em comparação com o grupo controle.

Anteriormente na literatura, variante em heterozigose no gene *HOXA13* foi relacionada como responsável pela síndrome *Hand-Foot-Genital* (MORTLOCK; INNIS, 1997). Entre as alterações descritas nessa condição estão os defeitos de fusão dos ductos de Müller, que variam de septo longitudinal vaginal a útero e cérvix duplos, em pacientes do sexo feminino (EKICI et al., 2013).

A variante identificada em P17 atinge o éxon 1 do gene *HOXA1*, que é composto por dois éxons, sendo considerado um regulador de processos como expressão gênica, morfogênese e diferenciação. *HOXA1* está localizado mais a 3' em relação à família de genes *HOX*, tornando-o o primeiro a ser expresso durante o desenvolvimento (LIU et al., 2013). De fato, os genes *HOXA1-4* possuem papel fundamental, em mamíferos, para o desenvolvimento da cabeça, conforme demonstrado na **Figura 27** (WANG et al., 2024). Adicionalmente, *HOXA1* é

considerado essencial para o correto desenvolvimento do tronco cerebral, ouvido interno e coração (MAKKI; CAPECCHI, 2011).

Vale ressaltar que um grupo de doenças genéticas estão relacionadas a variantes em homozigose no gene *HOXA1*. Como exemplo, podemos citar duas doenças autossômicas recessivas: a Síndrome Bosley-Salih-Alorainy, caracterizada por deficiência auditiva, malformações cardíacas, hipotonia facial e atraso no desenvolvimento; e a Síndrome de disgenesia do tronco cerebral Athabasca, que possui sinais como deficiência intelectual, defeitos cardíacos conotrunciais e hipotonia facial (WANG et al., 2024).

A variante c.393C>A, identificada na paciente P17, não foi encontrada nos bancos de dados ClinVar, gnomAD e dbSNP. Além disso, essa alteração resulta na inserção de um códon de terminação prematuro, o que pode acarretar na formação de proteína truncada. De fato, os genes da família *HOX* atuam em diferentes momentos durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, os genes pertencentes a essa família que podem influenciar no fenótipo de MRKH são aqueles localizados mais próximos à região 5', expressando-se em fases mais tardias no desenvolvimento embrionário.

Portanto, devido a sua participação no desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, os genes *HOX* são considerados candidatos para MRKH. Entretanto, com base nos dados disponíveis na literatura, o gene *HOXA1* não parece ter influência no processo de diferenciação dos ductos de Müller e, portanto, não há evidências que permitam confirmar que a variante c.393C>A seja a causa da malformação uterovaginal observada em P17.

## 10.2 PACIENTES MRKH SEM VARIANTE RELEVANTE IDENTIFICADA

A técnica de sequenciamento de exoma não identificou variantes relevantes em quatro pacientes com MRKH avaliadas neste trabalho (P3, P13, P14 e P18). Da mesma maneira, também não foram identificadas, nestas pacientes, CNVs pelo CMA.

Embora o CMA seja uma técnica de citogenética molecular capaz de identificar alterações submicroscópicas com resolução superior ao cariótipo convencional, as microdeleções e microduplicações estão presentes em aproximadamente 10% das

pacientes diagnosticadas com MRKH. Em adição, existem limitações associadas a essa metodologia como a não identificação de variações estruturais balanceadas como translocações, inserções e inversões (BRAKTA et al., 2023).

A aplicação do sequenciamento de exoma foi inserida no presente trabalho como uma ferramenta para a busca de variantes que justifiquem o quadro clínico das pacientes participantes. Essa metodologia é considerada robusta permitindo a análise da porção codificadora, que representa 1-2% do genoma. Contudo, é importante ressaltar que assim como em outras metodologias, existem limitações pertinentes a essa técnica. Dentre essas limitações podemos citar: falta de cobertura para algumas regiões codantes, principalmente regiões ricas em GC, limitação de detecção de CNVs e de detecção de variantes em regiões não codificadoras (WORTMANN et al., 2022).

Além das limitações técnicas, também deve-se considerar que a ausência de variantes relevantes nestas pacientes pode sugerir a contribuição de outros aspectos na patogênese da MRKH. De fato, a fisiopatologia dessa doença ainda é amplamente desconhecida. Apesar de existirem evidências de que componentes genéticos estão associados, não se pode descartar a possibilidade de que fatores ambientais tenham contribuição na ocorrência da Síndrome. Esses fatores podem influenciar no período embrionário e dar origem a um uma variedade de fenótipos. Como exemplo disso, temos o dietilestilbestrol, um estrogênio sintético capaz de aumentar o risco de malformações genitais, e a talidomida, capaz de induzir fenótipos similares a MRKH. Contudo, os estudos relacionando esses aspectos ainda são limitados (CHEN et al., 2022).

Da mesma maneira, não se pode descartar a possibilidade de que outros aspectos, não avaliados por meio deste trabalho, tenham contribuição na ocorrência da MRKH. Dentre eles podemos citar os fatores epigenéticos, que podem estar envolvidos em casos esporádicos de malformações uterinas, assim como podem modificar a severidade do fenótipo induzido por alterações genéticas, explicando a variabilidade fenotípica em pacientes MRKH. Vale ressaltar que o estudo epigenético é desafiador devido a provável restrição da assinatura epigenética ao tecido específico, ou seja, as estruturas derivadas dos ductos de Müller (FONTANA et al., 2017).

Embora os estudos envolvendo grandes coortes familiares sejam escassos, eles são capazes de auxiliar na identificação não apenas de variantes patogênicas,

mas também na análise dos aspectos clínicos associados a MRKH. Além disso, outro aspecto importante é que com esses estudos, se torna possível observar se a variante identificada segrega juntamente com o fenótipo, o que contribui para a compreensão do padrão de herança (WILLIAMS et al., 2017).

Em diversos estudos com mulheres diagnosticadas com MRKH, a correlação genótipo-fenótipo é inconsistente (BRAKTA et al., 2023). Ao longo dos anos um número crescente de doenças que não seguem o padrão de herança Mendeliano vem sendo identificadas. Sabe-se que variantes existentes em diferentes genes podem agir em conjunto para a expressão de um fenótipo. Dessa maneira, um fenótipo complexo observado em um paciente, não poderia ser explicado unicamente pela presença de variantes de forma isolada, mas quando identificadas simultaneamente, atuam de maneira sinérgica, originando o fenótipo apresentado. Sendo assim, é possível que MRKH tenha uma herança poligênica/oligogênica/digênica (BJØRSUM-MEYER et al., 2016; CHU et al., 2022; MUKHERJEE et al., 2021).

A análise da rede de interação proteína-proteína (*protein-protein interaction – PPI*) pode auxiliar na avaliação do potencial patogênico das CNVs identificadas em pacientes MRKH, como demonstrado por Pontecorvi et al. (2021). Embora, individualmente, os genes possam não ter um significado clínico aparente, sua avaliação conjunta em uma rede de interação pode exercer influência sobre o fenótipo manifestado.

Parte da dificuldade identificar a etiologia da MRKH, está relacionada a sua grande variabilidade fenotípica. É possível notar que na literatura existem diversas abordagens que têm sido empregadas na tentativa de esclarecer esse aspecto complexo. Uma extensa lista de genes candidatos já foi reportada, entretanto, sua função no desenvolvimento dos ductos de Müller ainda não está bem estabelecida, o que, por sua vez, é em grande parte atribuído à escassez de estudos funcionais nesse campo (THOMSON et al., 2023).

Dentre os outros aspectos que contribuem com o limitado conhecimento a respeito da etiologia da Síndrome, podemos citar: coortes pequenas, falta de padronização nos estudos, pouca investigação dos membros da família da paciente afetada e limitações no estudo da progênie, já que essas mulheres só conseguem filhos biológicos através de fertilização *in vitro* realizada por útero de substituição ou por meio de transplante uterino (KYEI-BARFFOUR et al., 2021). Em adição, pacientes com MRKH muitas vezes apresentam características fenotípicas que se sobrepõem a

outras doenças existentes. Dessa maneira, a aplasia útero vaginal pode ser responsável pela queixa de amenorreia primária em pacientes diagnosticados com outras síndromes (JOLLY et al., 2023; KAPCZUK; KĘDZIA, 2021).

Como exemplo disto, podemos citar o trabalho recente conduzido por Roth et al. (2024), onde foi relatada a presença concomitante de Síndrome de Rubinstein-Taybi (SRT) e MRKH. Neste estudo, foi identificada uma variante patogênica em *CREBBP*, mapeado no cromossomo 16 (16p13.3). Esse gene é responsável por cerca de 50-60% dos casos de SRT, que é uma condição caracterizada por baixa estatura, deficiência intelectual, anomalias faciais, entre outros aspectos clínicos. Embora a SRT esteja associada a alterações genitourinárias, ela não é classicamente associada a anomalias müllerianas. Devido ao papel regulatório de *CREBBP* durante o período embrionário, autores sugerem que variantes responsáveis por SRT também poderiam predispor a um espectro de anomalias müllerianas, incluindo MRKH.

### 10.3 PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL COM MRKH

#### 10.3.1 Síndrome da Insensibilidade Androgênica

##### P12

➤ Variante Causal - *AR:c.2111G>A* (NM\_000044.4)

Na paciente P12, o sequenciamento de exoma revelou a presença de uma variante provavelmente patogênica em hemizigose no gene *AR*.

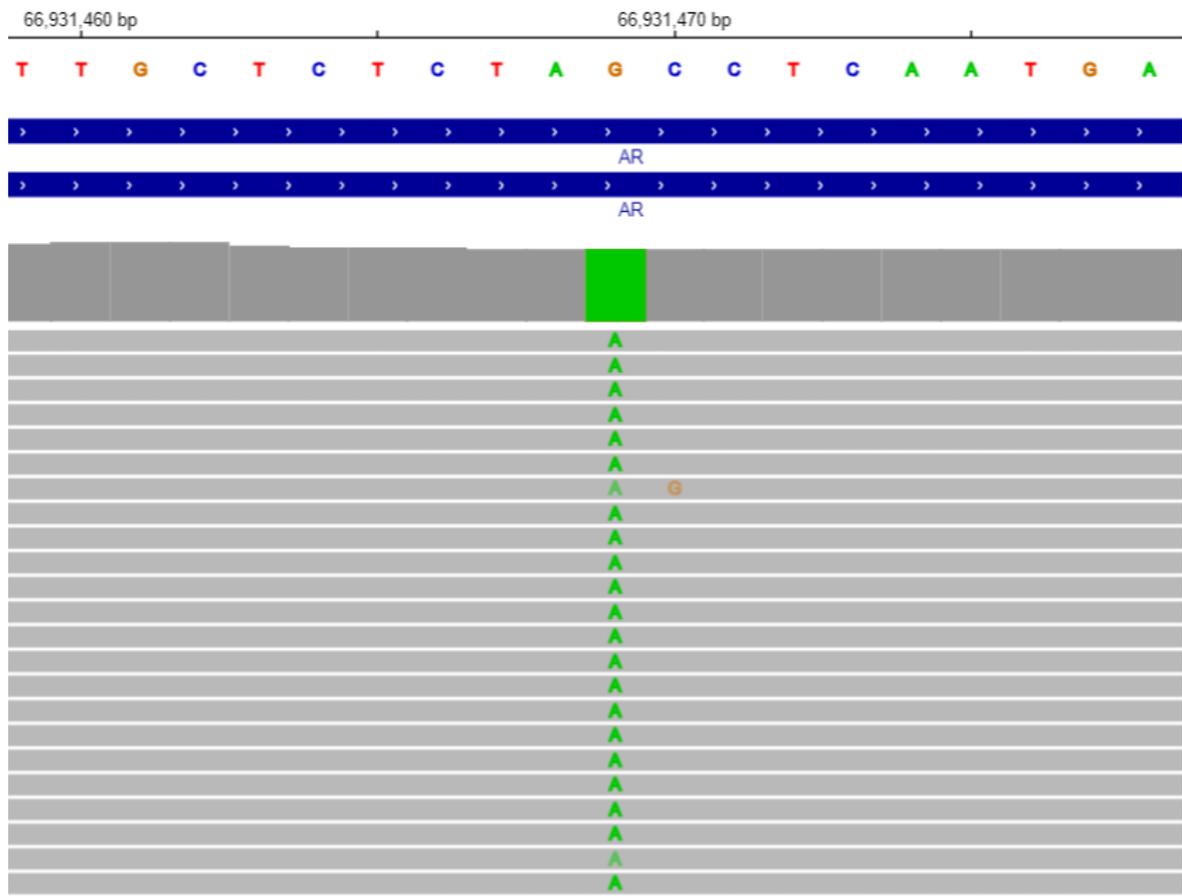
Apesar de P12 apresentar características fenotípicas femininas, desenvolvimento de mamas e genitália externa feminina, ela também apresenta raros pelos pelo corpo e testosterona acima dos níveis esperados para o sexo feminino. Em adição, paciente relata que possui diversos casos na família de mulheres com queixa

de amenorreia primária. Apesar de não ter sido possível a avaliação dessas mulheres, acredita-se que apresentem fenótipo similar ao observado em P12.

Dentre as pacientes avaliadas em nosso estudo, P12 foi a única que apresentou cariótipo 46, XY e PCR positiva para detecção de *SRY*. Esses resultados, obtidos no estudo anterior, fizeram com que a hipótese diagnóstica de AIS fosse levantada.

Variantes no gene *AR* estão associadas a essa condição clínica, já que esse gene desempenha papel importante nos processos de masculinização e virilização do indivíduo 46, XY. Dessa maneira, uma disfunção no receptor de andrógenos acarreta o comprometimento da ação dos hormônios que se ligam a ele para exercerem sua função no tecido alvo.

Com a realização da técnica de sequenciamento de exoma, foi detectada a variante *AR*:c.2111G>A. Essa variante *missense*, identificada em hemizigose, está localizada no gene *AR*, mapeado no cromossomo Xq11-12 (**Figura 29**). A variante encontrada preenche quatro critérios de patogenicidade (PM1, PM2, PM5, PP2 e PP3), sendo classificada como possivelmente patogênica. As ferramentas de predição *in silico*, Revel, *Mutation Taster*, MetaLR e GenoCanyon classificaram a variante como deletéria.



**Figura 29.** Visualização da variante identificada no gene AR no Integrative Genomics Viewer (IGV).

Esse achado permitiu a confirmação do diagnóstico de AIS na sua forma completa (CAIS), provocada pela substituição de guanina por adenina (c.2111G>A) no éxon 4 do gene *AR*. Essa substituição leva a alteração do aminoácido serina por asparagina na posição 704 (p.Ser704Asn). A variante c.2111G>A não foi encontrada no banco de dados *The Androgen Receptor Gene Mutations Database* (ARBD) (<http://androgendb.mcgill.ca/>), gnomAD e ClinVar, sugerindo que seja uma nova variante.

Embora a alteração identificada em nossa paciente não conste nos bancos de dados, variantes semelhantes localizadas nesta mesma posição foram reportadas previamente na literatura. As variantes c.2111G>T (p.Ser703Ile), c.2110A>T (p.Ser703Cys), c.2110A>G (p.Ser703Gly) já foram identificadas por Chin et al. (2012), Audi et al. (2010), Deeb et al. (2005) e Ahmed et al. (2000), respectivamente.

A numeração dos aminoácidos e nucleotídeos do gene *AR* foi atualizada e agora está baseada na sequência de referência NM\_000044.2, conforme descrito no banco de dados (<http://androgendb.mcgill.ca/>). Com essa atualização, a numeração dos códons 473-919 mudou para 474-920, levando a um deslocamento de +1 na numeração das mutações. Portanto, a variante 704 identificada na paciente corresponde a variante 703 descrita anteriormente na literatura.

A variante identificada em P12 está localizada no éxon 4 do gene *AR*. Esse éxon, juntamente com os éxons 5, 6, 7 e 8, são responsáveis pela codificação do domínio LBD que participa na ligação a andrógenos e proteínas co-ativadoras (YUAN et al., 2018). Grande parte das variantes já descritas estão localizadas no domínio LBD, indicando que seja um *hotspot* mutacional (GALANI et al., 2008; ANDRADE, 2012).

Para o funcionamento do AR é necessário que o seu domínio LBD se ligue ao hormônio androgênico. Essa ligação irá promover a translocação do AR para o núcleo, onde irá sofrer dimerização. Uma vez translocado para o núcleo da célula, o AR promove a ligação entre seu domínio DBD e elementos de resposta androgênica (ARE), localizados nas regiões promotoras de genes responsivos a andrógenos, influenciando na transcrição dos genes alvo (AURILIO et al., 2020; LEE et al., 2024; LI; AL-AZZAWI, 2009).

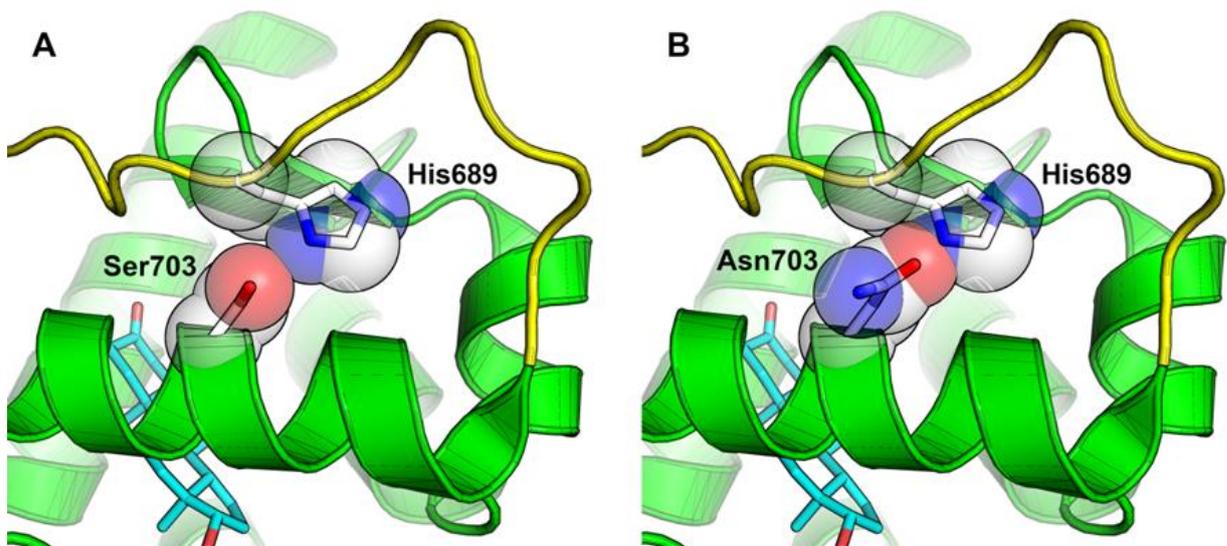
A ligação do AR a testosterona ou dihidrotestosterona no citoplasma, induz uma alteração conformacional no receptor. Portanto, variantes presentes no *AR* impactam no seu funcionamento, influenciando na resposta aos hormônios andrógenos (CHIN et al., 2012).

Conforme apresentado na **Figura 30A**, os resíduos Ser703 e His689 interagem por meio de uma ligação de hidrogênio com distância de 2.7 angstroms. Essa distância curta sugere uma interação relativamente forte, o que auxilia na manutenção da conformação estrutural do extenso loop onde a His689 está localizada. O estudo de modelagem aqui proposto, mostra que o aminoácido alterado, apesar de estar em um dos éxons que participam na formação do domínio LBD, não está em contato direto com o ligante (**Figura 30AB**). Esses resíduos, His689 e Ser703, participam de outras ligações de hidrogênio que mantêm o loop na conformação apropriada para manter estruturado o ambiente hidrofóbico do sítio de ligação do ligante.

Na paciente P12 o resíduo de serina foi alterado para uma asparagina na posição 704 (p.Ser704Asn). Nesta situação, o resíduo de asparagina ficaria em

choque com a His689 (**Figura 30B**), obrigando o loop onde esta se localiza a adotar outra conformação.

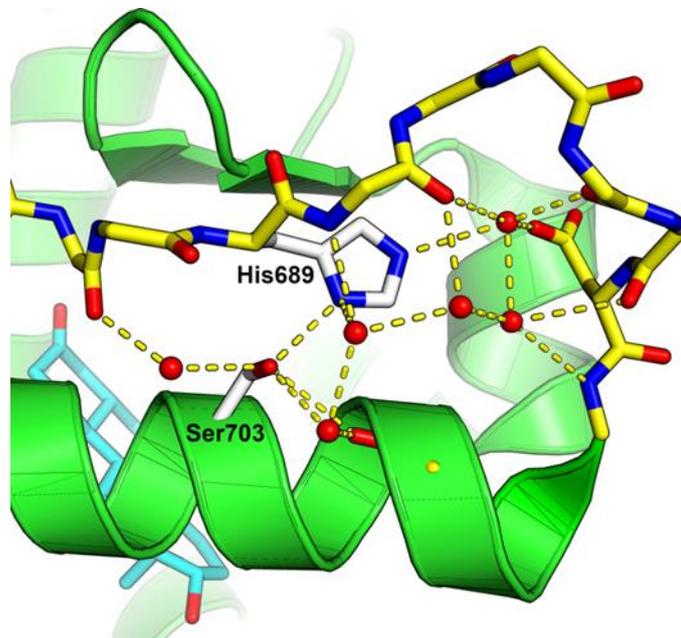
Diante desse cenário, uma possível hipótese para explicar o impacto da alteração identificada na paciente é que a troca de aminoácidos ocasiona uma mudança conformacional do loop onde se encontra a His689 para que o novo resíduo seja acomodado. Essa mudança conformacional pode modificar a dinâmica de associação e dissociação do ligante ao sítio.



**Figura 30.** Estrutura cristalográfica do complexo formado pelo AR e o ligante dihidrotestosterona (PDB 1T7R). **(A)** Domínio LBD original, representado em verde, ligado ao hormônio endógeno dihidrotestosterona (em ciano). Nele a Ser703 faz uma ligação de hidrogênio com a His689. **(B)** Domínio LBD, representado em verde, com a mutação Ser703Asn ligado ao hormônio endógeno dihidrotestosterona (em ciano). Um choque forte observado entre Asn703 e His689. O loop onde His689 se localiza e que é perturbado pela mutação Ser703Asn está em amarelo. Ser703, Asn703 e His689 estão rotulados e apresentados como bastões e esferas transparentes.

Uma extensa rede de ligações de hidrogênio no receptor AR que envolve a Ser703 e várias moléculas de água é essencial para posicionar o loop onde a His689 se encontra em sua conformação nativa (**Figura 31**). A variante Ser703Asn, além de causar um impedimento estérico devido à substituição da serina por asparagina, impede a formação dessa rede de ligações de hidrogênio. Variantes já descritas na literatura, como Ser703Ile, Ser703Cys e Ser703Gly produzem o mesmo efeito, uma

vez que as cadeias laterais desses aminoácidos não participam das ligações de hidrogênio.



**Figura 31.** Rede de ligações de hidrogênio no receptor AR que envolve a Ser703 e posiciona o loop onde a His689 se encontra em sua conformação nativa. Além do impedimento estérico causado pela substituição da serina por asparagina, a mutação Ser703Asn impede a formação dessa rede de ligações de hidrogênio. As mutações Ser703Ile, Ser703Cys e Ser703Gly produzem o mesmo efeito, pois as cadeias laterais desses aminoácidos não participam de ligações de hidrogênio. As esferas vermelhas representam moléculas de água estruturais, observadas com excelente densidade eletrônica em várias estruturas *wild type*. Os traços em amarelo representam ligações de hidrogênio. O receptor AR está representado como um *cartoon* verde, o loop onde a His689 se localiza está representado como bastões e colorido em amarelo, e algumas cadeias laterais não estão representadas para facilitar a visualização. Ser703 e His689 estão rotuladas e representadas como bastões em branco. O ligante di-hidrotestosterona está representado como bastões e colorido em ciano.

Dessa maneira, a hipótese diagnóstica levantada anteriormente de que P12 é portadora de AIS, passa a ser confirmada no presente trabalho com a inclusão dos dados obtidos por sequenciamento de exoma. A nova variante AR:c.2111G>A identificada explica o quadro clínico da paciente, resultando em um fenótipo feminino.

### 10.3.2 Septo Vaginal Transverso

#### P15

A paciente P15 apresenta características sexuais secundárias desenvolvidas, cariótipo normal para o sexo feminino, queixa de amenorreia primária e toque vaginal de aproximadamente 3 cm. Embora essas características clínicas sejam compatíveis com o diagnóstico de MRKH, essa hipótese foi afastada devido a identificação de SVT. Em adição, com a realização de exames de imagem foi evidenciado sistema coletor duplo bilateral, o que pode ser sugestivo de malformação renal. Contudo, a paciente não estava disponível para mais avaliações.

O SVT se configura um tipo de ADM que possui apresentação clínica semelhante ao observado em pacientes com MRKH (DIETRICH; MILLAR; QUINT, 2014b). Mulheres acometidas por essa condição frequentemente reportam queixas de amenorreia primária e dores abdominais. Sendo assim, dentre outras malformações do trato reprodutor feminino, o SVT possui relevância clínica significativa dentro do contexto de diagnóstico diferencial (ACOG, 2018).

Sua presença pode ocasionar uma complicação conhecida por hematocolpo, condição caracterizada por vagina distendida devido ao acúmulo de sangue proveniente da menstruação (TANITAME et al., 2021). Esse achado foi observado na paciente P15 que foi submetida a correção cirúrgica. Dessa forma, a presença de SVT juntamente com útero funcional, é considerada uma emergência sendo necessária intervenção médica (PASSOS; BRITTO, 2020).

Assim como outras ADM, a patogênese do SVT ainda não é conhecida. Entretanto, acredita-se que seja decorrente de um comprometimento na canalização da placa vaginal (DELIGEOROGLOU et al., 2012). Em adição, o relato da presença concomitante de SVT e hímen imperfurado em duas irmãs pode sugerir a contribuição de fatores genéticos em sua etiologia. A ocorrência simultânea dessas duas malformações do trato reprodutor feminino foi reportada em outros raros relatos na literatura, porém não na mesma família (ABOUEDDAHAB; GUELZIM; KOUACH, 2022).

Em trabalho desenvolvido por Lin e colaboradores (2021) foi investigado o papel da enzima ADAMTS18, membro da família de proteases A *Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs* (ADAMTS), que desempenham diferentes funções no organismo. Para avaliação do papel de ADAMTS18 no desenvolvimento do trato reprodutor feminino, foram utilizados camundongos nocautes (*Adamts18<sup>-/-</sup>*). Dentre os achados, foi identificada atresia vaginal em 41% das fêmeas, desenvolvimento normal da vagina em 53% e septo vaginal em 6%, além de também ter sido identificado baixos níveis de estradiol e níveis aumentados de mRNA do gene *Bcl-2* nas fêmeas *Adamts18<sup>-/-</sup>*. Os resultados observados sugerem que ADAMTS18 pode influenciar na fusão dos ductos müllerianos e na apoptose das células vaginais, contribuindo para abertura vaginal em camundongos.

Nesse mesmo contexto, em estudo anterior conduzido por Rodriguez e colaboradores (1997), foi observado que camundongos transgênicos que expressavam BCL2 humano na mucosa vaginal, apresentavam comprometimento na apoptose das células epiteliais vaginais, o que resulta em vagina fechada.

O correto diagnóstico e manejo de pacientes com SVT é relevante, visto que além das complicações como hematocolpo, essa condição impacta também na vida sexual e reprodutiva dessas mulheres. O tratamento do hematocolpo é essencial tanto para manter a fertilidade da paciente afetada quanto para reduzir os riscos de endometriose. Além disso, o SVT é uma malformação rara e que frequentemente possui o diagnóstico realizado na adolescência (KAMAL; LAKHDAR; BAIDADA, 2020).

O sequenciamento de exoma não identificou variantes que possam justificar o quadro de malformação vaginal observado em P15, sendo necessários mais estudos para elucidação. Adicionalmente, a melhor compreensão das alterações decorrentes da malformação do trato reprodutor feminino, contribui para uma abordagem mais precisa no que diz respeito ao diagnóstico, tratamento e apoio às mulheres (LANKFORD; MANCUSO; APPEL, 2013).

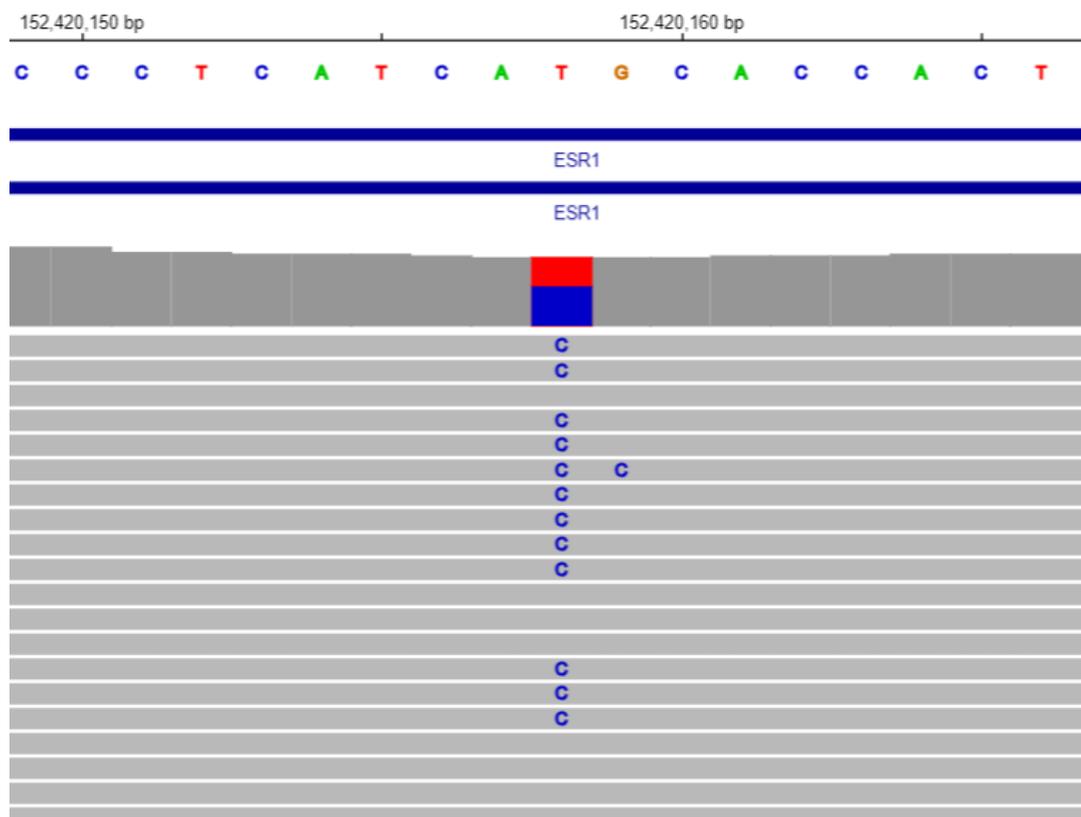
## 10.4 PACIENTES NÃO CLASSIFICADAS COMO MRKH

### 10.4.1 Sem Diagnóstico Definido

P4

➤ *ESR1*:c.\*57T>C (NM\_000125.3)

Em associação ao quadro clínico de P4, o sequenciamento de exoma revelou a presença de uma variante em heterozigose no gene *ESR1* que resulta na mudança de um único nucleotídeo na região 3'UTR. A variante c.\*57T>C, preenche um critério de patogenicidade (PM2) e um critério benigno (BP7), sendo classificada pelos critérios ACMG como VUS (**Figura 32**).



**Figura 32.** Visualização da variante identificada no gene *ESR1* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV).

P4 apresenta útero hipoplásico, vagina curta e ausência de desenvolvimento mamário (tabela 6). Diante desses achados clínicos, em nosso estudo anterior, sugerimos que a resistência a estrógeno devido a uma variante em seu receptor, pudesse explicar o quadro clínico observado nessa paciente.

Os receptores estrogênicos  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) e  $\beta$  ( $ER\beta$ ), codificados pelo gene *ESR1* e *ESR2*, respectivamente, são os principais mediadores da ação do estrógeno no organismo. Sabe-se que esse hormônio participa do controle de diversos processos biológicos como o desenvolvimento mamário, desenvolvimento do trato reprodutor feminino e reprodução (BERNARD et al., 2017).

A variante identificada em P4 atinge o gene *ESR1*, mapeado no cromossomo 6q25.1. Esse gene é responsável pela codificação do  $ER\alpha$  que é expresso em diferentes tecidos como fígado, glândula mamária, hipófise, hipotálamo, cérvix e vagina (HAMILTON et al., 2017). *ESR1* é composto por nove éxons e sete íntrons e, devido ao *splicing* alternativo, é capaz de dar origem a três diferentes isoformas, sendo elas:  $ER\alpha\Delta 3$ ,  $ER\alpha 36$  e  $ER\alpha 46$  (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015; RUSIDZÉ et al., 2021).

Existem escassos relatos na literatura de indivíduos com mutação no gene *ESR1*. Variante nesse gene foi descrita pela primeira vez em uma paciente do sexo feminino por Quaynor et al., (2013). Neste estudo foi identificada uma variante em homozigose (c.1125G>T) em paciente com queixa de amenorreia primária, presença de útero hipoplásico e ausência de desenvolvimento mamário, quadro clínico semelhante ao observado em P4.

Em 2017, Bernard e colaboradores identificaram em três indivíduos (duas irmãs e um irmão) de uma família consanguínea a presença de uma variante *missense* em homozigose no gene *ESR1*. A probanda descrita nesse estudo assim como sua irmã apresentavam ausência de desenvolvimento mamário, demonstrando que  $ER\alpha$  é necessário para o desenvolvimento adequado. Em adição aos fenótipos, também foi observado na probanda presença de útero hipoplásico, e em sua irmã, amenorreia primária (BERNARD et al., 2017).

Estudos com objetivo de melhor compreender a função de  $ER\alpha$  também foram conduzidos em modelos animais. Camundongos nocautes apresentaram comprometimento no desenvolvimento de mamas, infertilidade e útero hipoplásico, fenótipos semelhantes ao observado nas pacientes descritas na literatura (HAMILTON; ARAO; KORACH, 2014).

A variante c.\*57T>C, identificada em P4, está localizada na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *ESR1*. Essa região é conservada e possui tamanho de 4.3 kb, aproximadamente duas vezes o tamanho da região codante (2 kb) desse gene, sendo considerada crítica para o controle e estabilidade do mRNA (KENEALY et al., 2000). Em adição, a região 3'UTR possui mais sequências ricas em AU quando comparado com a região codante desse gene. De fato, sequências ricas em AU também podem influenciar na estabilidade do mRNA, sendo um indicador de desestabilização (KENEALY et al., 2000).

De maneira geral, regiões 3'UTR possuem sítios que exercem influência pós transcricional na expressão dos genes. Essa influência ocorre devido à presença de sítios para ligação de proteínas regulatórias assim como para microRNAs. Alterações tanto na sequência quanto no tamanho de 3'UTR podem afetar a expressão gênica. Dessa forma, variantes localizadas na região 3'UTR podem provocar doenças devido a desregulação do processo de tradução (RATAN et al., 2016).

Estudo realizado em 93 mulheres com MRKH por Brucker e colaboradores (2017), sugeriu a hipótese de que receptores hormonais possam estar envolvidos na etiologia dessa condição. Nesse estudo, os autores identificaram três variantes no gene *OXTR* e seis variantes no gene *ESR1*, sendo uma delas presente na região 3'UTR (c.\*96C>T) em paciente com MRKH tipo I. Essa variante está localizada no sítio de ligação do microRNA-206, o que pode alterar a expressão gênica.

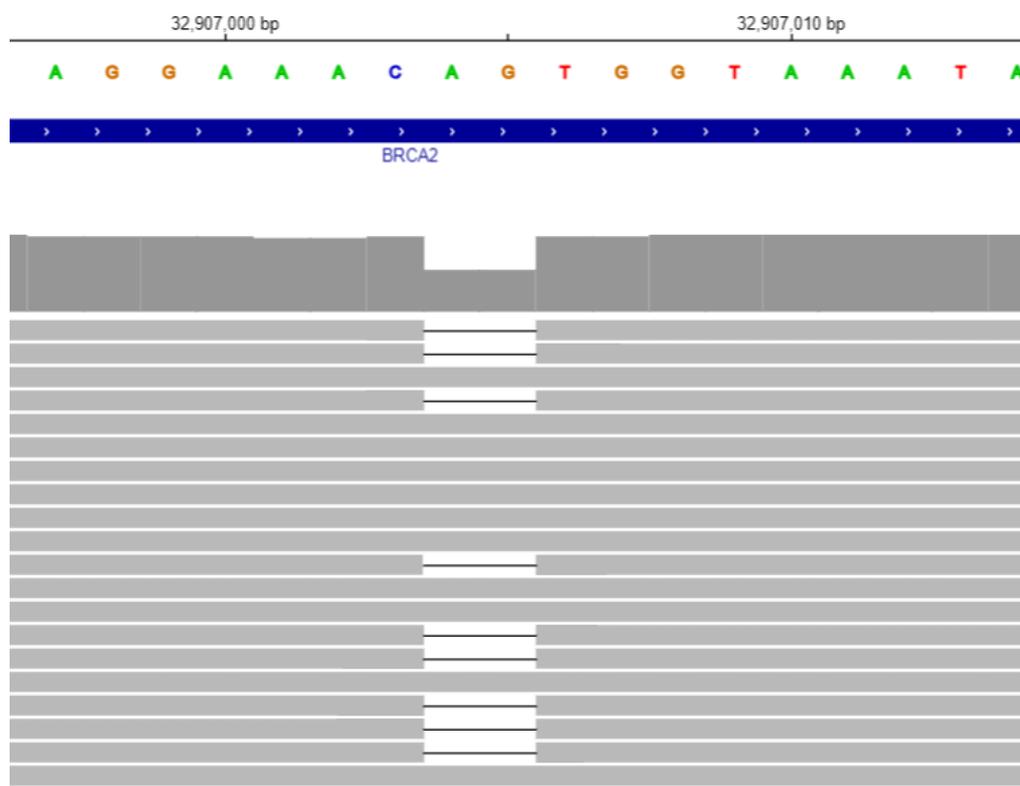
Em adição ao quadro clínico apresentado pela paciente P4, aos 20 anos de idade, apresentou sinais de hipoglicemia, sendo diagnosticada com deficiência de hormônio do crescimento (GH). Sabe-se que, além de desempenhar papel no desenvolvimento mamário, o estrogênio também participa do mecanismo de *feedback* do eixo hipotalâmico-hipofisário. Portanto, esse hormônio é reconhecido como um importante regulador da produção de GH, tendo seus receptores expressos tanto no hipotálamo quanto na hipófise (AVTANSKI et al., 2014).

A variante identificada em P4 no gene *ESR1* pode estar relacionada à disfunção do receptor de estrogênio, podendo comprometer o desenvolvimento mamário e o trato reprodutor da paciente, já que se sabe a importância desse gene para diversos processos biológicos. Dessa maneira, é possível que a variante c.\*57T>C seja responsável pelo quadro clínico observado em P4, contudo, o efeito dessa variante necessita de investigações adicionais.

Mulheres com MRKH possuem o desenvolvimento normal das características sexuais secundárias. A ausência de desenvolvimento mamário observado em P4 possivelmente afasta o diagnóstico de MRKH. Contudo, a possibilidade de uma apresentação clínica atípica dessa síndrome não deve ser desconsiderada. Até onde se tem conhecimento, esse é o primeiro relato de uma paciente com agenesia vaginal, útero hipoplásico e ausência de desenvolvimento mamário.

### P16

O sequenciamento de exoma revelou a presença de uma variante patogênica em heterozigose do tipo *frameshift* localizada no gene *BRCA2* (c.1389\_1390delAG) (**Figura 33**). Em adição, a metodologia também demonstrou uma duplicação do éxon 13 (chr13:32.920.954-32.921.044), localizado no mesmo gene.



**Figura 33.** Visualização da variante identificada no gene *BRCA2* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV).

A variante *BRCA2*:c.1389\_1390delAG (NM\_000059.3), ocasiona a deleção de duas bases no éxon 10, o que acarreta na mudança do quadro de leitura após o códon 464 (p.Val464fs), e a formação de *stop codon* prematuro. Essa variante preenche três critérios de patogenicidade (PVS1, PS4, PM2 e PP5), está descrita no dbSNP e reportada como patogênica no banco de dados ClinVar.

Sabe-se que variantes bialélicas localizadas no gene *BRCA2* estão associadas a Anemia de Fanconi, grupo de complementação D1. A identificação de duas variantes nesse gene, juntamente com as malformações observadas em P16 nos levaram a considerar a hipótese diagnóstica de Anemia de Fanconi, uma doença de grande variabilidade fenotípica, caracterizada por falência progressiva da medula óssea, malformações congênitas e predisposição ao câncer (MEHTA; EBENS C., 2002).

Dentre as alterações descritas em pacientes com Anemia de Fanconi e presentes em P16 destacam-se a microcefalia, polegar direito lateralizado, útero hipoplásico, ânus imperfurado e possível alteração renal (MEHTA; EBENS C., 2002; SHIMAMURA; ALTER, 2010). Entretanto, como a duplicação identificada pelo sequenciamento de exoma envolve apenas um único éxon, foi utilizado o teste de MLPA como método confirmatório, já que essa técnica permite a análise do número de cópias em determinados seguimentos do genoma (STUPPIA et al., 2012). No entanto, o MLPA não mostrou alterações de número de cópias do gene *BRCA2* e, portanto, a duplicação do éxon 13 vista ao exoma era provavelmente um artefato, sendo afastada a hipótese diagnóstica de Anemia de Fanconi. A ausência de confirmação por MLPA da alteração identificada pelo exoma, ressalta a limitação dessa técnica em detectar principalmente pequenas CNVs (1-4 éxons) (SAMARAKOON et al., 2014; TAN; SHEN, 2022). Dessa maneira, é recomendada a validação das CNVs identificadas por exoma utilizando outra metodologia (GUO et al., 2013; MARCHUK et al., 2018).

Dando continuidade à análise do quadro de P16, as alterações identificadas até então incluem útero de tamanho reduzido e queixa de amenorreia primária. Em adição, durante consulta ginecológica, foi relatada presença de membrana no intróito vaginal. A volumosa dilatação da vagina observada na RM pode sugerir presença de hímen imperfurado. Porém, até o momento não foi possível a diferenciação entre agenesia vaginal, hímen imperfurado e septo vaginal transversal, sendo necessário

realizar avaliações adicionais. No âmbito da investigação clínica de pacientes que relatam amenorreia primária, é essencial considerar a investigação dessas condições como parte do diagnóstico diferencial (ACOG, 2018). A identificação de uma dessas alterações descarta o diagnóstico de MRKH.

Assim como a MRKH, a Associação VACTERL é uma condição rara sem etiologia conhecida. Usualmente, para o diagnóstico clínico dessa doença é necessário que o indivíduo apresente pelo menos três malformações que formam o acrônimo: (V) anomalia vertebral, (A) atresia anal, (C) anomalias cardíacas, (TE) fístula traqueoesofágica, (R) displasia renal e de (L) membros (CHEN et al., 2016).

Levando em consideração os critérios diagnósticos, observa-se que P16 possui malformações em sistemas encontrados alterados em indivíduos com VACTERL, são elas: atresia anal e polegar direito lateralizado com implantação proximal (anomalia de membro). As avaliações renais dessa paciente tiveram resultados divergentes nos exames de imagem no que diz respeito à forma e dimensões desse órgão.

De fato, a ocorrência simultânea de MRKH e VACTERL foi previamente reportada na literatura. Em estudo conduzido por Bjørsum-Meyer et al. (2016), duas pacientes diagnosticadas com VACTERL e MRKH foram avaliadas. Ambas apresentavam atresia anal e anomalias renais, além de alterações em outros sistemas. Essa combinação de atresia anal e anomalias renais em pacientes com VACTERL e MRKH também foi observada em outros estudos conduzidos por Rall et al. (2015), Linke et al. (2005) e Komura et al. (2007). Além disso, alterações geniturinárias são mais frequentes naqueles pacientes com diagnóstico de VACTERL que se apresentam com atresia anal e anomalias renais (KANG et al., 2018).

A ocorrência concomitante dessas duas condições, MRKH e VACTERL, é rara. Adicionalmente, devido à grande heterogeneidade associada a VACTERL, o diagnóstico dessa condição é complexo. Outros aspectos também contribuem para a dificuldade de conclusão diagnóstica, como o fato da existência de desordens que apresentam características que se sobrepõem ao fenótipo clínico observado em pacientes com VACTERL. Dentre elas, podemos citar a Associação de MURCS, Anemia de Fanconi e Síndrome CHARGE (VAN DE PUTTE et al., 2019).

Apesar de grande parte dos casos de VACTERL possuírem ocorrência esporádica, casos familiares sugerem que fatores genéticos possam estar associados a etiologia dessa condição (VAN DE PUTTE et al., 2020). Causas monogênicas envolvendo os genes *FGF8*, *FOXF1*, *HOXD13*, *LPP*, *TRAP1*, *PTEN* e *ZIC3* foram

associadas a VACTERL anteriormente (KOLVENBACH et al., 2021). Para análise do exoma de P16 também foram avaliados genes específicos relacionados a malformações anorretais e VACTERL, contudo não foram identificadas alterações relevantes.

Prosseguindo com a análise do quadro do P16, aos 16 anos de idade foi identificado presença de hematocolpo volumoso e a paciente foi encaminhada para correção cirúrgica. Foi observada a presença de seio urogenital com óstio uretral junto a parede vaginal (seio urogenital), dessa maneira, foi realizada a separação das estruturas, sendo confeccionado neouretra e vaginoplastia.

Persistindo a dúvida em relação a anatomia uterina dessa paciente e motivados pela divergência dos resultados de exames descritos no prontuário, foi solicitada a repetição de exames como RM e USG que já tinham sido realizados em anos anteriores. Diante dos resultados obtidos nesses exames realizados mais recentemente, a hipótese diagnóstica de MRKH foi afastada em P16 devido a identificação de útero com volume aproximado de 83,3cm<sup>3</sup> com corpo principal à esquerda e pequeno corno rudimentar direito.

Portanto, P16 permanece sem diagnóstico definido, sendo essencial a continuidade da investigação para a conclusão diagnóstica. A variante patogênica em *BRCA2* (c.1389\_1390delAG), confere risco aumentado de predisposição ao câncer para P16, já que esse gene atua como um importante supressor tumoral (XIE et al., 2022). No entanto, o sequenciamento de exoma de P16 não revelou alterações que justificassem o quadro de malformação genital.

#### 10.4.2 Síndrome CHARGE

##### P10

- Variante Causal - *CHD7*:c.5405-7G>A (NM\_017780.4)

Na paciente P10, o sequenciamento de exoma revelou a presença de uma variante patogênica em heterozigose no gene *CHD7*, que leva à substituição de

guanina por adenina e altera o *splicing* do gene (**Figura 34**). A variante c.5405-7G>A preenche três critérios de patogenicidade (PM2, PP3 e PP5) e foi relatada como patogênica no ClinVar. As ferramentas de predição *in silico* de alteração de sítio de *splicing* como dbSCSNV e splice AI classificaram a variante c.5405-7G>A, presente em P10, como deletéria. Alterações no gene *CHD7* estão associadas a Síndrome CHARGE.



**Figura 34.** Visualização da variante identificada no gene *CHD7* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV).

A Síndrome Charge é uma desordem congênita com incidência estimada de 1:10000 a 1:15000 nascidos vivos. Essa condição possui herança autossômica dominante e forma o acrônimo que reflete um conjunto de características clínicas: coloboma (**C**), cardiopatia congênita (**H**), atresia de coana (**A**), atraso no desenvolvimento (**R**), anomalias geniturinárias (**G**) e anomalias de orelha (**E**) (HUDSON; TRIDER; BLAKE, 2017).

Alterações no gene *CHD7* foram relacionadas com a Síndrome CHARGE pela primeira vez em 2004 (VISSERS et al., 2004). Esse gene, que está localizado no braço longo do cromossomo 8 (8q12), é formado por 38 éxons, sendo um deles não codificante, e produz uma proteína com 2997 aminoácidos (BERGMAN et al., 2011).

Variantes patogênicas nesse gene são encontradas em aproximadamente 90% dos pacientes com o diagnóstico clínico, sendo em sua maioria *de novo* (HEFNER; FASSI, 2017). Apesar de variantes do tipo *missense* já terem sido descritas, elas representam uma minoria dos casos. A maioria das variantes encontradas são *nonsense* e *frameshift* (HSU et al., 2014). Deleções parciais ou completas de *CHD7* também são raras (BERGMAN et al., 2011).

A hipótese diagnóstica de que P10 é portadora dessa condição foi previamente levantada em nosso estudo anterior, tomando como base as características observadas e os critérios para diagnóstico clínico descritos na literatura.

Inicialmente, os critérios clínicos foram propostos por Blake et al. (1998) com a divisão em critérios maiores e menores. Sendo os maiores presentes frequentemente nesses pacientes e raramente em outras condições, e os critérios menores, presentes em menor frequência. Segundo Blake, para o diagnóstico clínico de CHARGE era necessário apresentar quatro critérios maiores ou três maiores e três menores.

Em 2005, Verloes propôs uma atualização nos critérios e dividiu em três classificações possíveis: CHARGE típica, parcial e atípica, sendo que para classificar em típica são necessários três critérios maiores ou dois maiores e dois menores (TRIDER et al., 2017). Posteriormente, Hale et al (2016) sugeriu a inclusão de variantes patogênicas em *CHD7* como um dos critérios maiores para o diagnóstico de CHARGE, dessa maneira indivíduos com fenótipo mais brando poderiam ser identificados (**Figura 35**). Nessa nova proposta são necessários dois critérios maiores mais qualquer número de critérios menores.

Verloes (2005)	Hale (2016)
<b>Critérios Maiores</b>	<b>Critérios Maiores</b>
✓ Coloboma	✓ Coloboma
✓ Atresia de Coana	✓ Atresia de Coana ou fenda palatina
✓ Canal semicircular hipoplásico	✓ Anormalidades de orelha, incluindo canal semicircular hipoplásico
	✓ Variantes Patogênica em <i>CHD7</i>
<b>Critérios Menores</b>	<b>Critérios Menores</b>
✓ Malformações cardíaca	✓ Disfunção do nervo cranial incluindo perda auditiva
✓ Malformação de ouvido médio	✓ Dificuldade de alimentação/disfagia
✓ Disfunção rombencefálica incluindo perda de audição neurosensorial	✓ Anomalias cerebrais estruturais
✓ Disfunção hipotálamo-hipofisária (gonadotrofina ou deficiência de hormônio de crescimento)	✓ Atraso no desenvolvimento/deficiência intelectual/autismo
✓ Deficiência intelectual	✓ Disfunção hipotálamo-hipofisária (gonadotrofina ou deficiência de hormônio de crescimento)
	✓ Malformação cardíaca ou esofágica
	✓ Anomalias renais/esqueléticas, anomalias de membros
<b>Critérios de Inclusão</b>	<b>Critérios de Inclusão</b>
CHARGE Típica: 3 maiores ou 2 maiores + 2 menores	CHARGE: 2 maiores + qualquer número de critérios menores
CHARGE parcial: 2 maiores + 1 menor	
CHARGE atípica: 2 maiores + 0 menores ou 1 maior e 3 menores	

**Figura 35.** Comparação dos critérios para diagnóstico de CHARGE. Fonte: Adaptada de Hale et al., 2016.

Levando em consideração os critérios atualizados por Hale et al (2016), observa-se que P10 possui 3 critérios maiores que incluem coloboma, malformação de orelha externa e variante patogênica em *CHD7*. Em adição, a paciente também apresenta 2 critérios menores que incluem disfunção hipotálamo-hipofisária e anomalias renais/esqueléticas.

O comprometimento oftalmológico está presente em aproximadamente 75-90% dos pacientes com CHARGE, sendo o coloboma a alteração principal. Entretanto, outras características como microftalmia e catarata, por exemplo, também podem ser encontradas (HSU et al., 2014).

Estudos anteriores à descoberta de *CHD7* e realizados com pacientes com diagnóstico clínico de CHARGE, identificaram que defeitos cardíacos conotrunciais e defeitos do septo atrioventricular eram frequentes nesse grupo de pacientes. Contudo, após a descoberta do gene responsável por essa condição, o trabalho conduzido por

Corsten-Janssen e colaboradores (2013) observaram a existência de diversos tipos de defeitos cardíacos em indivíduos com variante patogênica em *CHD7*. Dessa maneira, um espectro variado de alterações cardíacas estavam presentes em 74% dos indivíduos avaliados, sendo os defeitos conotruncais e do septo atrioventricular super-representados. Apesar dos defeitos cardíacos congênitos acometerem grande parte dos indivíduos com diagnóstico clínico de CHARGE (75% a 80%), P10 não apresentou alterações nos exames cardíacos realizados.

A atresia de coana é outra malformação que pode estar presente em pacientes com CHARGE, mas também pode estar associada a outras síndromes como Treacher Collins e Apert (HALL, 1979). Aqueles pacientes que possuem atresia de coana bilateral configuram uma emergência perinatal já que iniciam um quadro de angústia respiratória logo após o nascimento, levando a uma cianose cíclica que é amenizada por episódios de choro do recém-nascido. Por outro lado, o diagnóstico pode passar despercebido em indivíduos que apresentam a forma unilateral, pois normalmente não necessitam de intervenção imediata.

A atresia de coana pode vir acompanhada de perda auditiva, fazendo com que a avaliação da audição se torne importante. Pacientes com CHARGE que possuem atresia de coana também podem apresentar anosmia (BLAKE et al., 1998; KELLER; KACKER, 2000). A alteração de coana não foi avaliada em P10, no entanto a paciente reporta hiposmia sendo identificada em ressonância magnética a ausência dos bulbos olfatórios.

Durante a infância, pacientes com CHARGE podem apresentar diminuição da taxa de crescimento e lento ganho de peso. Diversos fatores podem contribuir para esse cenário, tais como: número grande de hospitalizações, problemas de alimentação, defeitos cardíacos e cirurgias. Contudo, alterações hormonais como deficiência de GH e hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) já foram descritas anteriormente na literatura (DIJK; BOCCA; RAVENSWAALJ-ARTS, 2019).

A hipoplasia genital causada por quadro de HH se configura um achado comum em pacientes com CHARGE (HSU et al., 2014). Em indivíduos do sexo masculino, sinais como criptorquidia e micropênis podem sugerir a presença de HH. Em contrapartida, em indivíduos do sexo feminino, o diagnóstico normalmente é realizado tardiamente, quando as mulheres não atingem a puberdade de maneira espontânea (BERGMAN et al., 2011).

P10 veio ao nosso serviço de Genética Médica com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento das características sexuais secundárias. A ausência dessas características pode ser explicada não somente pela presença de HH, identificado pelos exames hormonais, como também pela ausência de ovários, identificada pela RM. Em adição, P10 também apresenta hipoplasia de lábios menores, característica já reportada anteriormente na literatura (RAGAN et al., 1999).

Por outro lado, apesar de ser esperado que em mulheres com CHARGE os órgãos sexuais internos estejam dentro dos padrões de normalidade, em P10 foi observado agenesia uterovaginal. Quadro semelhante foi reportado uma única vez por Reynaert e colaboradores (2016) que descreveram paciente com diagnóstico de CHARGE, deleção em heterozigose em *CHD7*, HH e agenesia de útero e ovário. Autores sugerem a possibilidade da agenesia uterovaginal estar associada a deleção encontrada na paciente.

Diante do exposto, a hipótese diagnóstica levantada anteriormente de que P10 é portadora da Síndrome CHARGE, passa a ser confirmada no presente trabalho com a inclusão dos dados obtidos por sequenciamento de exoma. A variante *CHD7:c.5405-7G>A* identificada explica o quadro clínico da paciente.

#### 10.4.3 Anomalia Mülleriana diferente da MRKH

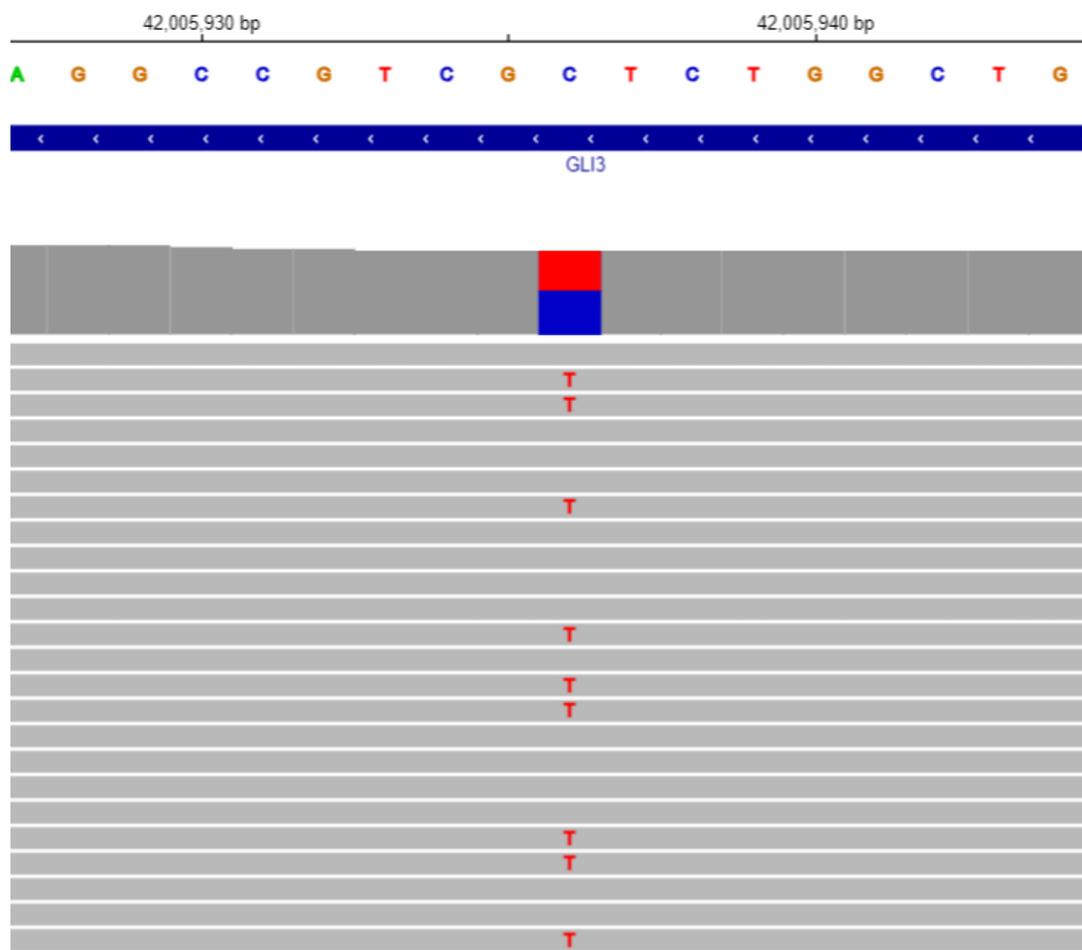
##### P11

- *MAMLD1:c.964C>T* (NM\_001177465.3)
- *GLI3:c.2735G>A* (NM\_000168.6)

Em associação ao quadro clínico de P11, o sequenciamento de exoma revelou a presença de uma variante VUS e uma variante possivelmente benigna, localizadas nos genes *MAMLD1* e *GLI3*, respectivamente.

A variante *missense* identificada em heterozigose em P11 atinge o éxon 15 do gene *GLI3*, mapeado no cromossomo 7p14.1 e preenche um único critério de

patogenicidade (PM2), e dois critérios benignos (BP4, BP6), sendo classificada como possivelmente benigna. A variante c.2735G>A leva a substituição de guanina por adenina, o que acarreta na mudança do aminoácido serina por asparagina (p.Ser912Asn) (**Figura 36**).



**Figura 36.** Visualização da variante identificada no gene *GLI3* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV).

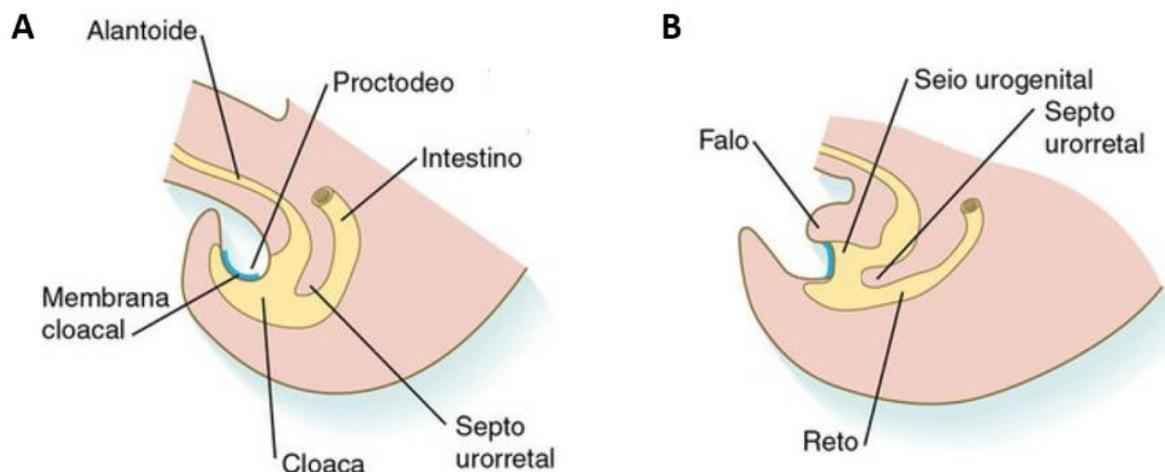
Variantes identificadas no gene *GLI3* estão associadas a doenças como Síndrome de Pallister-Hall (PHS) e Síndrome de cefalopolisindatilia de Greig. Apesar de ambas as condições serem causadas por variantes em *GLI3*, elas possuem diversas características que não se sobrepõem. Em adição, existem diferentes fenótipos clínicos que podem ser causados por alterações nesse gene (JOHNSTON et al., 2005; NARUMI et al., 2010).

No exame físico de P11 foi observado desenvolvimento normal das características sexuais secundárias juntamente com presença de vagina curta e queixa de dispareunia, contudo, sem relato de amenorreia primária. Por meio de avaliação radiológica, foi observada presença de útero septado e vagina contigua a bexiga e ao colo do útero (CUNHA, 2018).

Relatos semelhantes ao observado em P11 foram realizados anteriormente na literatura. Choudhary; Verma; Choudhary, (2011), descreveram uma paciente com presença de útero bicorno e hipospadia feminina. Estudo realizado por Amin e colaboradores (2007) identificou uma mulher com MRKH e presença de anomalia do seio urogenital. Apesar dessa descrição possuir similaridades ao quadro observado em nossa paciente, os achados clínicos de P11 não são compatíveis com o diagnóstico de MKRH.

O estudo do períneo em P11 ficou prejudicado devido a recusa do uso do gel pela paciente. Dessa forma, é possível que o canal vaginal tenha algum grau de estenose, o que explicaria a queixa de dispareunia. Alterações genitais como atresia vaginal, atresia uretral, hipoplasia genital e presença de seio urogenital, decorrentes de mutações em *GLI3* em pacientes com PHS, já foram reportadas anteriormente na literatura (JOHNSTON et al., 2005; NARUMI et al., 2010).

Defeito no desenvolvimento da uretra está relacionado a falha do desenvolvimento do seio urogenital. Durante o período embrionário, o septo urorretal é responsável por dividir a cloaca em duas porções distintas: reto e seio urogenital (**Figura 37AB**). Tanto a uretra feminina quanto o epitélio vaginal são estruturas derivadas no endoderma do seio urogenital (MOORE; PERSAUD, 2000).



**Figura 37.** Esquemas ilustrativos demonstrando a divisão da cloaca. **(A)** Embrião na quinta semana do desenvolvimento embrionário. **(B)** Crescimento do septo urorretal em direção a membrana cloacal, dividindo essa estrutura em reto e seio urogenital. Fonte: Adaptado de Carlson, 2014.

O gene *GLI3* é responsável pela codificação da proteína GLI3 que é um fator de transcrição do tipo *zinc finger*. Esse fator de transcrição atua na via de sinalização *Sonic Hedgehog* (SHH), que constitui uma via importante durante o desenvolvimento embrionário, além de atuar na manutenção da homeostase do organismo (KOTULAK-CHRZAŚCZ; KMIĘĆ; WIERZBICKI, 2021).

GLI3 atua como um regulador *downstream* da via de sinalização SHH, podendo agir tanto na repressão da transcrição de genes quanto na ativação gênica (BIESECKER, 2006). Na ausência de SHH, GLI3 é clivado gerando um repressor que regula negativamente genes alvo. O inverso ocorre na presença de SHH, fazendo com que GLI3 funcione como ativador transcricional e regule positivamente genes alvo (DÉMURGER et al., 2015).

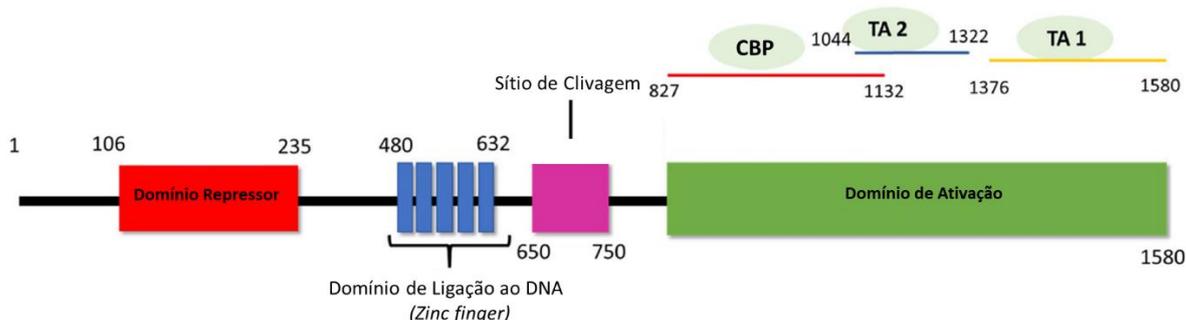
Sabe-se que SHH participa do desenvolvimento da genitália externa e dos órgãos sexuais secundários (KOTHANDAPANI et al., 2020). *Shh* é expresso no epitélio da cloaca, estando envolvido no processo de septação dessa estrutura assim como no crescimento do tubérculo genital, que posteriormente irá se diferenciar em pênis ou clítoris. *Shh* também é importante na regulação do desenvolvimento de estruturas que são derivadas do seio urogenital (HARAGUCHI et al., 2007).

O gene *GLI3* também é altamente expresso no útero e vagina. Variante do tipo *missense* no gene *GLI3* já foi descrita em paciente com MRKH por Chu e

colaboradores (2022). Segundo autores, variantes em *GLI3* podem levar ao comprometimento no desenvolvimento do útero e vagina, podendo resultar em mulheres portadoras de MRKH.

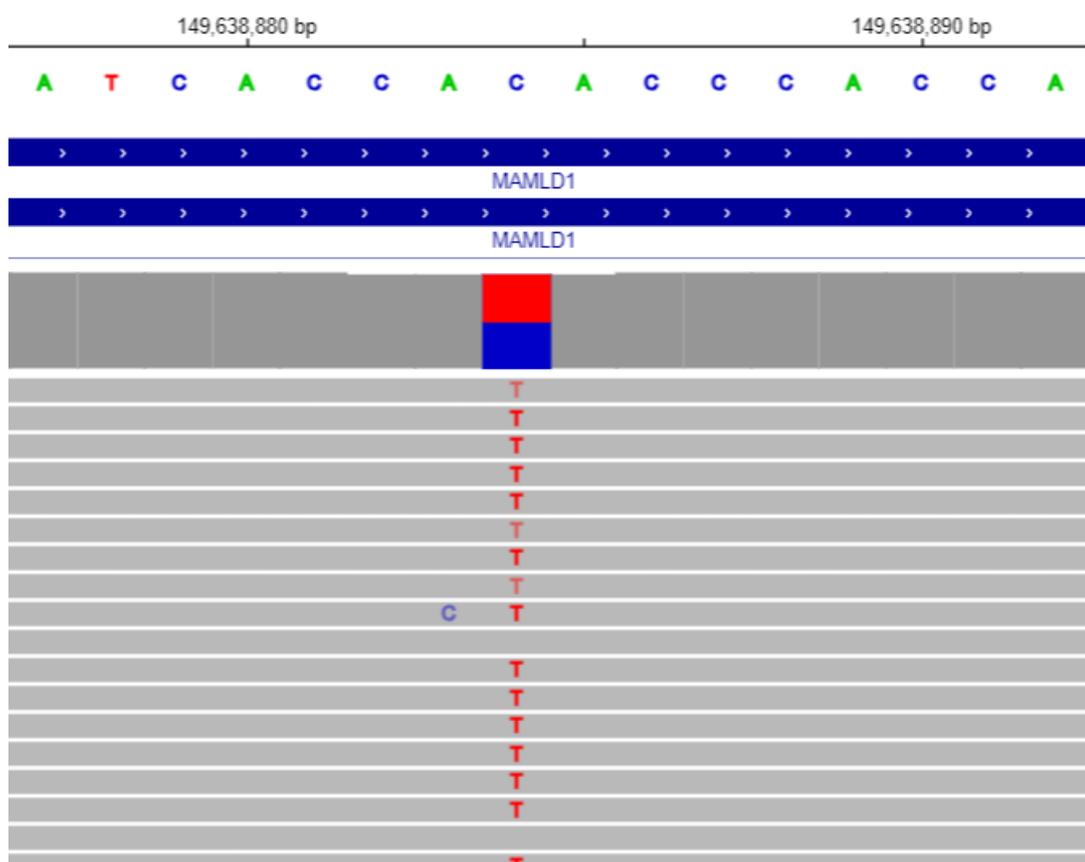
Narumi e colaboradores (2010) descreveram uma paciente de 3 anos de idade, portadora de PHS, que apresentava hidrometrocolpo secundário a atresia vaginal. A análise molecular identificou uma variante do tipo *nonsense* presente em heterozigose no gene *GLI3*. Em outro estudo, conduzido por Haraguchi e colaboradores (2001), foi observado ausência de desenvolvimento de genitália externa em camundongos nocautes para *Shh*. No mesmo ano, Mo et al. (2001) também avaliaram camundongos *Shh* *-/-* que apresentaram cloaca persistente com comunicação do canal anorretal e urinário. Em adição, os camundongos *Gli3* *-/-* demonstraram estenose anal.

Conforme demonstrado na **Figura 38**, o gene *GLI3* possui 15 éxons e é composto por domínio repressor, 5 domínios de ligação ao DNA do tipo *zinc finger*, sítio proteolítico de clivagem, um domínio de ativação, que contém a região responsável pela ligação de GLI3 ao seu co-ativador CBP (*CREB-binding protein*) além do domínio de transativação 1 (TA1) e 2 (TA2) (MATISSEK; ELSAWA, 2020; WANG et al., 2022). A variante identificada em P11 atinge o éxon 15 do gene *GLI3*. O éxon 15 é responsável pela codificação da região que é necessária para ativação da proteína, estando os aminoácidos 827-1132 envolvidos na ligação de GLI3 ao seu co-ativador CBP (MATISSEK; ELSAWA, 2020). Dessa maneira, apesar do papel de *GLI3* no desenvolvimento do sistema urogenital ser desconhecido (KOTHANDAPANI et al., 2020), uma hipótese para o quadro apresentado por P11 é que a variante em *GLI3* possa causar desregulação da via de sinalização SHH, gerando as alterações urogenitais observadas na paciente estudada.



**Figura 38.** Estrutura da proteína GLI3. A proteína GLI3 é composta por domínio repressor N-terminal (aminoácidos 106-235), domínio de ligação ao DNA do tipo *zinc finger* (aminoácidos 480-632), domínio de ativação C-terminal e domínio de transativação 1 (TA1) e 2 (TA2). CBP (*CREB-binding protein*)  
Fonte: adaptada de Matissek; Elswa, 2020.

Também foi identificada na paciente P11 uma variante *missense* em heterozigose no gene *MAMLD1*, mapeado no cromossomo X. Essa variante preenche um único critério de patogenicidade (PM2), sendo classificada como VUS. A variante c:964C>T leva a substituição de citosina por timina, o que acarreta na mudança do aminoácido histidina por tirosina (**Figura 39**).



**Figura 39.** Visualização da variante identificada no gene *MAMLD1* no *Integrative Genomics Viewer* (IGV).

O gene *MAMLD1* está localizado no braço longo do cromossomo X (Xq28) e é composto por 7 éxons. Por meio do *splicing* alternativo, com ou sem o éxon 4, os éxons 3-6 são capazes de gerar duas proteínas distintas (RATAN et al., 2016).

Embora sua função ainda não seja completamente compreendida, acredita-se que *MAMLD1* esteja associado ao desenvolvimento sexual durante o período embrionário e em processos relacionados com a função reprodutiva (FLÜCK et al., 2019). É possível também que esse gene possua função importante na biossíntese

de testosterona, já que é expresso nos testículos fetal e adulto (MIYADO; FUKAMI; OGATA, 2022).

*MAMLD1* é considerado um dos genes causais para indivíduos portadores de 46, XY DDS, possuindo na literatura diversas variantes já descritas. Em adição, esse gene também está associado a ocorrência de hipospadias (FUKAMI et al., 2008; MIYADO; FUKAMI; OGATA, 2022).

Hipospadia é uma malformação congênita comum em indivíduos do sexo masculino, com incidência de 1:300 nascidos vivos e é caracterizada pela abertura da uretra em posição incomum (porção ventral do pênis) (CHEN et al., 2010; KALFA et al., 2011). Já na hipospadia feminina, com incidência aproximada de 1:500.000 nascidas vidas, a abertura da uretra está localizada na parede anterior da vagina e tem origem devido a uma interrupção do desenvolvimento do seio urogenital (BHAT et al., 2010; CHOUDHARY; VERMA; CHOUDHARY, 2011).

Existem poucos relatos na literatura de indivíduos 46, XX com variantes em *MAMLD1*. De fato, esse gene pode atuar na função ovariana, já que ele é expresso nos ovários humanos e de camundongos (MIYADO; FUKAMI; OGATA, 2022). Essa hipótese é corroborada pelo estudo conduzido por Marozzi et al. (2000) onde foi identificada deleção Xq28 na presença de falência ovariana prematura. Em adição, variante *missense* em homozigose foi reportada em paciente com clitoromegalia, gônadas em fita, útero hipoplásico e amenorreia primária (BRANDÃO et al., 2011). Flück e colaboradores (2019) também identificaram variante em heterozigose associada a amenorreia primária, ovários, útero pequeno e genitália externa feminina.

A variante c:964C>T identificada em P11 atinge o éxon 3 do gene *MAMLD1*, que é responsável por codificar cerca de 80% de sua proteína. Dessa maneira, uma mutação nessa região poderia levar a formação de uma proteína truncada (CHEN et al., 2010). Tendo em vista que o papel de *MAMLD1* ainda necessita de elucidações e que esse gene está associado a presença de hipospadias, é possível que ele contribua para o fenótipo observado em P11, já que ela apresenta uma malformação que faz com que o meato uretral esteja localizado na parede anterior da vagina.

Além do gene *MAMLD1* estar associado a hipospadia, o gene *GLI3* também foi identificado previamente em pacientes portadores dessa condição, estando associado ao desenvolvimento sexual e gonadal. A hipótese de que DDS possa estar relacionado ao padrão de herança oligogênico, foi levantada anteriormente por Li e colaboradores (2020). Indivíduos 46, XY DDS associados a variantes em *MAMLD1*

podem apresentar duas ou mais variantes em genes envolvidos com distúrbio de diferenciação, sugerindo que o fenótipo apresentado nesses pacientes possa ser determinado por múltiplos genes. Dessa maneira, é possível que as variantes identificadas em P11, nos genes *MAMLD1* e *GLI3*, possam contribuir para o quadro clínico observado.

## 10.5 DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho incluiu a participação de 18 mulheres. O diagnóstico de MRKH foi confirmado em 12 das 18 pacientes (66,66%) que apresentavam suspeita clínica dessa condição. Além disso, duas mulheres permaneceram sem diagnóstico clínico definido e quatro mulheres são portadoras de outras condições. Esses achados ressaltam a importância de uma equipe multidisciplinar para a avaliação detalhada de cada caso.

Considerando que a MRKH promove alterações no sistema reprodutor feminino e, em alguns casos, em outros sistemas, parte das mulheres que recebem o diagnóstico dessa condição possuem impactos psicológicos. A conclusão do diagnóstico gera, nessas pacientes, questionamentos acerca do seu corpo e do seu papel social ou sexual como mulher (LISZEWSKA-KAPLON et al., 2020).

O impacto psicológico em pacientes diagnosticadas com MRKH não deve ser negligenciado, visto que podem ser desencadeadas diversas respostas emocionais como depressão, choque, confusão, vergonha e medo (HELLER-BOERSMA; EDMONDS; SCHMIDT, 2009). Dessa maneira, podemos elencar alguns pontos importantes para o manejo dessas pacientes como: (1) diagnóstico correto; (2) avaliação de possíveis malformações associadas; (3) tratamento e (4) suporte psicológico (ACOG, 2018; HERLIN, 2024).

A utilização de metodologias como CMA permitiu aos pesquisadores, ao longo dos anos, a identificação de CNVs em pacientes MRKH, contribuindo para a seleção de genes candidatos. Entretanto, a frequência dessas alterações é relativamente baixa, sendo encontradas em aproximadamente 10% das pacientes (HERLIN, 2024). No presente trabalho, das 12 pacientes que receberam o diagnóstico de MRKH, foram identificadas alterações submicroscópicas em duas (16,66%), atingindo as regiões genômicas 6q14.3 e 7q11.23, nas pacientes P6 e P8, respectivamente. Em outros estudos publicados anteriormente na literatura, a identificação de CNVs em frequências superiores a 10% também foram relatadas. Nik-Zainal e colaboradores (2011) investigaram 63 mulheres MRKH e encontraram deleções em 14% delas enquanto Sandbacka et al., (2013) identificaram CNVs em 8 de 50 mulheres com MRKH avaliadas, representando 16%.

O sequenciamento de exoma, aplicado no presente estudo, permite a avaliação de todos os genes, sem que seja necessária a hipótese de um gene alvo. A identificação de variantes, que possivelmente possam estar relacionadas aos quadros das pacientes, demonstra que o sequenciamento de exoma é uma ferramenta válida na busca de variantes nesse grupo de pacientes.

Essa metodologia permitiu a identificação de variantes em 12 das 18 mulheres aqui estudadas, além de ser eficaz na detecção das duas CNVs previamente identificadas por CMA. Dentre as alterações não identificáveis por outras técnicas, mas detectadas por sequenciamento de exoma, destacam-se seis variantes em seis genes distintos, observadas nas 12 mulheres com diagnóstico de MRKH. Em resumo, essas variantes são:

- *WT1*:c.-8\_-7delGC - identificada em quatro pacientes MRKH não relacionadas (P1, P5, P7 e P9);
- *SPEN*:c.9758\_9759delCT - identificada em apenas um caso (P2);
- *RET*:c.2188C>G e *KYNU*:c.447dupT - identificadas apenas na paciente P6;
- *WNT4*:c.-45delC - identificada somente na paciente P7;
- *HOXA1*:c.393C>A foi identificada apenas em um caso (P17);

Em quatro mulheres com diagnóstico de MRKH não foi possível identificar variantes que possam estar relacionadas ao quadro. Além disso, essa metodologia permitiu:

- Conclusão dos diagnósticos de P10 como Síndrome CHARGE e P12 como CAIS, com a identificação das variantes nos genes *CHD7* e *AR*, respectivamente;
- Identificação de variante nos genes *GLI3*:c.2735G>A e *MAMD1*:c.964C>T que podem estar relacionadas ao quadro clínico da paciente P11;
- Identificação da variante *ESR1*:c.\*57T>C que pode justificar o comprometimento no desenvolvimento mamário e malformação uterovaginal.

Algumas limitações foram enfrentadas ao longo da execução deste trabalho. Primeiramente, podemos citar a falta de acesso aos demais membros da família para avaliação e análise; e coorte relativamente pequena. Além disso, uma parcela das mulheres que estão em investigação não dá continuidade, o que dificulta a avaliação completa do quadro.

Todas as variantes identificadas, que possam justificar o quadro de agenesia/hipoplasia uterovaginal, foram observadas em heterozigose, o que reforça a hipótese de herança dominante. Contudo, até o momento, a análise de segregação foi realizada para somente uma variante e, portanto, o padrão de herança não pode ser determinado. Em adição, a possibilidade de penetrância incompleta e expressividade variável fornece maior complexidade nessas análises.

Muitas das variantes reportadas como associadas a MRKH são variantes de significado incerto e implica em cuidado na interpretação (HERLIN, 2024). É válido ressaltar que além da dificuldade relacionada a interpretação de variantes existem também algumas regiões no genoma com sequências repetitivas que podem ser melhor avaliadas por sequenciamento *long-read* (BUCHERT et al., 2022). Ademais, a publicação da nova versão do genoma humano (T2T), reportado recentemente por Nurk e colaboradores (2022), pode auxiliar nos estudos futuros na busca de variantes associadas à patogênese da MRKH.

Por fim, no presente estudo, a modelagem molecular forneceu informações válidas para a análise das variantes *missense* identificadas por exoma. A função da proteína está correlacionada com sua conformação e, portanto, o uso dessa ferramenta contribuiu para a avaliação do impacto da variante na estrutura tridimensional da proteína.

## 11 CONCLUSÃO

✓ O CMA identificou CNVs em duas pacientes avaliadas neste trabalho, representando 16,66% das mulheres com diagnóstico de MRKH;

✓ O sequenciamento de exoma identificou variantes candidatas em 66,66% das pacientes participantes e foi eficiente na detecção das duas CNVs identificadas anteriormente por CMA. Essa metodologia também permitiu a conclusão do diagnóstico de duas pacientes que não tinham seu diagnóstico estabelecido;

✓ Entre as 18 pacientes avaliadas, seis mulheres (33,33%) com suspeita clínica de MRKH não tiveram o diagnóstico confirmado, evidenciando a importância de uma avaliação detalhada em casos de suspeita clínica de MRKH;

✓ A conclusão do diagnóstico de P12 como AIS e de P15 como SVT, deixa evidente a importância do diagnóstico diferencial em mulheres com queixa de amenorreia primária e caracteres sexuais secundários desenvolvidos;

✓ A presença de duas mulheres com suspeita clínica de MRKH, que permaneceram sem diagnóstico definido, juntamente com o caso de uma paciente que apresenta anomalia mülleriana diferente da MRKH, destaca a importância de equipe multidisciplinar para avaliação desses casos;

✓ A técnica de sequenciamento de exoma possibilitou a identificação de variantes candidatas que podem estar associadas à patogênese da MRKH;

✓ As técnicas de CMA e sequenciamento de exoma detectaram a duplicação 7q11.23 na paciente P8, diagnosticada com MRKH, sugerindo potencial associação entre a agenesia uterovaginal e a síndrome de microduplicação 7q11.23.

## 12 APÊNDICE

### APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O (A) Senhor (a) está sendo convidado a participar do projeto: “Análise cromossômica por microarrays (CMA) em pacientes com Síndrome de Rokitansky”. O objetivo desta pesquisa é identificar regiões genômicas e/ou genes que contribuem para a etiologia da síndrome.

O (A) Senhor (a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa, sendo mantido o mais rigoroso sigilo de sua identidade através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo (a). Sua participação ocorrerá por meio do fornecimento de amostra biológica (sangue) para a realização de exames laboratoriais por meio do DNA extraído. O procedimento de coleta de sangue por punção venosa será feito com material estéril descartável de boa qualidade por profissional habilitado, podendo ocasionar um pouco de dor e formação de hematoma no local.

Os resultados obtidos neste projeto podem beneficiar o participante, através da identificação de genes relacionados a sua condição, o que pode permitir precisão no seu acompanhamento e de seus familiares, desde que consentido pelo senhor (a). Os dados do trabalho serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente.

Informamos que o Senhor (a) poderá se recusar a responder questões ou participar de algum procedimento que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa no momento em que desejar sem nenhum prejuízo e comprometimento em seu acompanhamento médico.

A participação na pesquisa é voluntária, isto é, não há qualquer tipo de pagamento por sua colaboração. Caso solicite, o participante poderá ser ressarcido pelos gastos com deslocamento e alimentação devido à participação nessa pesquisa. O ressarcimento só poderá ocorrer mediante comprovação. Além disso, será garantido atendimento imediato e /ou indenização diante de eventuais danos

**comprovadamente** decorrentes dessa pesquisa, vistas as medidas administrativas e judiciais cabíveis.

Solicitamos também sua autorização para armazenamento da amostra biológica de sangue em biorrepositório no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília para possíveis estudos futuros. O material coletado terá uma codificação alfanumérica e só poderá ser manuseada pelos indivíduos diretamente relacionados com o projeto.

Se o (a) Senhor (a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dra. Aline Pic Taylor, na Universidade de Brasília, telefone: (61) 3107-3083, em horário comercial ou Gabriela Corassa R. da Cunha, telefone: (61) 9977-0862 em horário comercial. Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

- ( ) Estou assinando em meu nome.
- ( ) Estou assinando em nome do meu dependente legal.

Se você estiver de acordo, por favor:

---

Nome / assinatura do voluntário ou responsável legal

---

Aline Pic Taylor

## 13 ANEXOS

### ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNB

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Análise Cromossômica por Microarray (CMA) em pacientes com Síndrome de Rokitansky

**Pesquisador:** Aline Pic

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 60695716.1.0000.5558

**Instituição Proponente:** Instituto de Biologia da Universidade de Brasília

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.132.513

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto "Análise Cromossômica por Microarray(CMA) em pacientes com Síndrome de Rokitansky", aprovado por este CEP em dezembro de 2016. Foi incluída uma nova metodologia de investigação (Sequenciamento de Exoma completo), porque alguns pacientes participantes do projeto de pesquisa não apresentaram alterações possíveis de serem observadas pelas metodologias aplicadas. Os autores também se manifestaram na notificação parcial pela extensão do cronograma da pesquisa

##### Objetivo da Pesquisa:

O presente trabalho tem como objetivo geral identificar regiões genômicas e/ou genes que contribuem para a etiologia da síndrome de Rokitansky, e como objetivos específicos: Descrever o conjunto de sinais clínicos observados em um grupo de 30 pacientes diagnosticados clinicamente com a síndrome de Rokitansky; Analisar o cariótipo destas pacientes; Avaliar a ocorrência de alterações submicroscópicas neste grupo de 30 pacientes; Investigar mutações no grupo de pacientes que não apresentarem alterações no CMA; Verificar a relação genótipo/fenótipo entre as alterações encontradas e o quadro clínico das pacientes.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme as relatadas no projeto inicial.

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.910-900

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3107-1918

**E-mail:** cepfm@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



Continuação do Parecer: 5.132.513

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa básica e clínica que poderá esclarecer importantes achados genéticos na Síndrome de Rokitansky.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentou todos os termos de apresentação obrigatória no projeto original, não havendo necessidade de novo TCLE para a consecução da pesquisa. Entretanto, na notificação parcial, a solicitante informa que o projeto deverá se estender até 2026, enquanto no novo cronograma a data do término do projeto informa que será em 2023, sem informar os meses.

**Recomendações:**

Corrigir o cronograma em conformidade com o solicitado por esse CEP, informando os meses e as respectivas atividades.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A emenda não apresenta implicações éticas e o colegiado julgou pela sua aprovação da mesma.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após apreciação na reunião dia 24/11/2021 do colegiado CEP/FM a emenda foi aprovada. OBS: De acordo com a Resolução CNS 466/12, nos incisos II.19 e II.20, cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP os relatórios parciais e final do seu projeto de pesquisa. Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_176149_5_E1.pdf	08/11/2021 11:30:41		Aceito
Outros	EMENDA_A_PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	08/11/2021 11:21:58	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Rokitansky.pdf	01/11/2021 08:56:25	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_GabrielaCorassa.pdf	18/10/2021 10:01:14	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Aline_Pic.pdf	18/10/2021 10:00:07	Gabriela Corassa Rodrigues da	Aceito

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



Continuação do Parecer: 5.132.513

Outros	Lattes_Aline_Pic.pdf	18/10/2021 10:00:07	Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Vanessa_Sodre_de_Souza.pdf	18/10/2021 09:59:36	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Silviene_Fabiana_de_Oliveira.pdf	18/10/2021 09:58:43	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Rosenelle_Oliveira.pdf	18/10/2021 09:58:11	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Mara_Santos_Cordoba.pdf	18/10/2021 09:56:52	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Juliana_Forte_Mazzeu.pdf	18/10/2021 09:56:25	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Daniela_Mara_de_Oliveira.pdf	18/10/2021 09:55:45	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Lattes_Ana_Carolina_Vaqueiro_Figueiredo.pdf	18/10/2021 09:54:51	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	13/09/2021 15:47:33	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_alteracoes_marcadas.docx	13/09/2021 15:43:27	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_alteracoes_incorporadas.pdf	13/09/2021 15:43:10	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	22/09/2016 09:23:44	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_assentimento_13_a_17_anos.pdf	22/09/2016 09:22:57	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	carta_de_encaminhamento_rokitansky.pdf	29/08/2016 20:45:28	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_assentimento_10_a_12_anos.pdf	09/07/2016 10:29:42	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	termo_de_assentimento_6_a_9_anos.pdf	09/07/2016 10:29:19	Gabriela Corassa Rodrigues da	Aceito

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



Continuação do Parecer: 5.132.513

Justificativa de Ausência	termo_de_assentimento_6_a_9_anos.pdf	09/07/2016 10:29:19	Cunha	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/07/2016 10:28:58	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Rokitasky_plataforma_brasil.pdf	04/07/2016 09:55:58	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aceite_Instituicao_Rokitansky.pdf	24/06/2016 10:23:55	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_de_responsabilidade_Rokitansky.pdf	24/06/2016 10:22:42	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito
Outros	Termo_de_imagem.pdf	24/06/2016 10:14:11	Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 28 de Novembro de 2021

Assinado por:

Antônio Carlos Rodrigues da Cunha  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

#### 14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUEDDAHAB, Z.; GUELZIM, K.; KOUACH, J. Familial occurrence of concomitant imperforate hymen and transverse vaginal septum: a case report. **Pan African Medical Journal**, v. 42, n. 207, 2022.

ABRAHAM, M. B. et al. Report and review of described associations of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome and Silver-Russell syndrome. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 51, n. 5, p. 555–560, 2015.

ACOG. Müllerian Agenesis: Diagnosis, Management, and Treatment. **Obstetrics & Gynecology**, v. 131, n. 1, p. e35–e42, 2018.

AHMED, S. F. et al. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 2, p. 658–665, 2000.

Al, Z. et al. Precocious puberty or growth hormone deficiency as initial presentation in Mayer-Rokitansky-kuster-Hauser syndrome: a clinical report of 5 cases. **BMC Pediatrics**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2022.

AL DANDAN, O. et al. A rare form of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: Case report and review of literature. **Case Reports in Women's Health**, v. 24, p. 6–8, 2019.

AL-MANSOUB, M. et al. KYNU, a novel potential target that underpins CD44-promoted breast tumour cell invasion. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 5, p. 2309–2314, 2021.

AMIN, M. U. et al. Mayer Rokitansky Kuster Hauser syndrome with urogenital sinus anomaly. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 17, n. 1, p. 57–58, 2007.

ANDRADE, M. S. DE. **Análise molecular do gene receptor de andrógeno em pacientes e familiares com Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos**. 2012. 127 f., il. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

ARIGHI, E.; BORRELLO, M. G.; SARIOLA, H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 4–5, p. 441–467, 2005.

AUDI, L. et al. Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 4, p. 1876–1888, 2010.

AURILIO, G. et al. Androgen receptor signaling pathway in prostate cancer: From genetics to clinical applications. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 1–14, 2020.

AVTANSKI, D. et al. Both estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  stimulate pituitary GH gene expression. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 1, p. 40–52, 2014.

BACKHOUSE, B. et al. Identification of Candidate Genes for Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome Using Genomic Approaches. **Sexual Development**, v. 13, n. 1, p. 26–34, 2019.

BAMSHAD, M. J. et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 11, p. 745–755, 2011.

BARBAGALLO, F. et al. Complete androgen insensitivity syndrome: From the relevance of an accurate genetic diagnosis to the challenge of clinical management. a case report. **Medicina (Lithuania)**, v. 57, n. 11, 2021.

BATISTA, R. L. et al. Androgen insensitivity syndrome: A review. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n. 2, p. 227–235, 2018.

BAYLE, A. et al. Whole exome sequencing in molecular diagnostics of cancer decreases over time: evidence from a cost analysis in the French setting. **European Journal of Health Economics**, v. 22, n. 6, p. 855–864, 2021.

BERGMAN, J. E. H. et al. Anosmia predicts hypogonadotropic hypogonadism in CHARGE syndrome. **Journal of Pediatrics**, v. 158, n. 3, p. 474–479, 2011.

BERNARD, V. et al. Familial multiplicity of estrogen insensitivity associated with a loss-of-function ESR1 mutation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 1, p. 93–99, 2017.

BHAT, A. et al. Female hypospadias with vaginal stones: A rare congenital anomaly. **Journal of Pediatric Urology**, v. 6, n. 1, p. 70–74, 2010.

BIASON-LAUBER, A. et al. A WNT4 Mutation Associated with Müllerian-Duct Regression and Virilization in a 46,XX Woman . **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 8, p. 792–798, 2004.

BIASON-LAUBER, A. et al. WNT4 deficiency-a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: A case report. **Human Reproduction**, v. 22, n. 1, p. 224–229, 2007.

BIESECKER, L. What you can learn from one gene: GLI3. **Journal of Medical Genetics**, v. 43, n. 6, p. 465–469, 2006.

BIONDI, R. M.; NEBREDA, A. R. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. **Biochemical Journal**, v. 372, n. 1, p. 1–13, 2003.

BJØRSUM-MEYER, T. et al. Vertebral defect, anal atresia, cardiac defect, tracheoesophageal fistula/esophageal atresia, renal defect, and limb defect association with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome in co-occurrence: two

case reports and a review of the literature. **Journal of Medical Case Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2016.

BLAKE, K. D. et al. Charge association: An update and review for the primary pediatrician. **Clinical Pediatrics**, v. 37, n. 3, p. 159–174, 1998.

BOMBARD, D. S.; MOUSA, S. A. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: Complications, diagnosis and possible treatment options: A review. **Gynecological Endocrinology**, v. 30, n. 9, p. 618–623, 2014.

BRAKTA, S. et al. Rare structural variants, aneuploidies, and mosaicism in individuals with Mullerian aplasia detected by optical genome mapping. **Human Genetics**, v. 142, n. 4, p. 483–494, 2023.

BRANDÃO, M. P. et al. MAMLD1 (mastermind-like domain containing 1) homozygous gain-of-function missense mutation causing 46,XX disorder of sex development in a virilized female. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 707, p. 129–131, 2011.

BRANDER, E. P. A.; VINCENT, S.; MCQUILLAN, S. K. Transverse Vaginal Septum Resection: Technique, Timing, and the Utility of Dilatation. A Scoping Review of the Literature. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 35, n. 1, p. 65–72, 2022.

BRINKMANN, A. O. Molecular basis of androgen insensitivity syndromes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 179, n. 1–2, p. 105–109, 2001.

BROPHY, P. D. et al. A gene implicated in activation of retinoic acid receptor targets is a novel renal agenesis gene in humans. **Genetics**, v. 207, n. 1, p. 215–228, 2017.

BRUCE, S. et al. Clinically distinct epigenetic subgroups in Silver-Russell syndrome: The degree of H19 hypomethylation associates with phenotype severity and genital and skeletal anomalies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 2, p. 579–587, 2009.

BRUCKER, S. Y. et al. Sequence variants in ESR1 and OXTR are associated with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 96, n. 11, p. 1338–1346, 2017.

BUCHERT, R. et al. Genome Sequencing and Transcriptome Profiling in Twins Discordant for Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 19, 2022.

BUREL, A. et al. Role of HOXA7 to HOXA13 and PBX1 genes in various forms of MRKH syndrome (congenital absence of uterus and vagina). **Journal of Negative Results in BioMedicine**, v. 5, p. 1–6, 2006.

CALLENS, N. et al. An update on surgical and non-surgical treatments for vaginal hypoplasia. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 5, p. 775–801, 2014.

CARLSON, B. M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2014.

CHATTERJEE, R. et al. Traditional and targeted exome sequencing reveals common, rare and novel functional deleterious variants in RET signaling complex in a cohort of living US patients with urinary tract malformations. **Hum Genetics**, v. 131, n. 11, p. 1725–1738, 2013.

CHATTERJEE, S.; PAL, J. K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. **Biology of the Cell**, v. 101, n. 5, p. 251–262, 2009.

CHEN, B. et al. Mutation analysis of the WNT4 gene in Han Chinese women with premature ovarian failure. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 30, n. 9, p. 2–4, 2011.

CHEN, M. J. et al. Concurrent exome-targeted next-generation sequencing and single nucleotide polymorphism array to identify the causative genetic aberrations of isolated Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Human Reproduction**, v. 30, n. 7, p. 1732–1742, 2015.

CHEN, N. et al. Perturbations of genes essential for Müllerian duct and Wölffian duct development in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 108, n. 2, p. 337–345, 2021.

CHEN, N. et al. Update on Mayer – Rokitansky – Küster – Hauser syndrome. **Frontiers of Medicine**, v. 16, n. 6, 2022.

CHEN, Y. et al. Mutational study of the MAMLD1-gene in hypospadias. **European Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 3, p. 122–126, 2010.

CHEN, Y. et al. The genetic landscape and clinical implications of vertebral anomalies in VACTERL association. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 7, p. 431–437, 2016.

CHEROKI, C. et al. Report of a del22q11 in a Patient With Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) Anomaly and Exclusion of WNT-4, RAR-gamma, and RXR-alpha as Major Genes Determining MRKH Anomaly in a Study of 25 Affected Women. **American journal of medical genetics**. Part A, v. 140A, p. 1339–1342, 2006.

CHIN, V. L. et al. A case of complete androgen insensitivity syndrome with a novel androgen receptor mutation. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 11–12, p. 1145–1151, 2012.

CHOUHARY, R.; VERMA, S.; CHOUHARY, G. R. Female hypospadias and congenital uterine müllerian anomaly with proved fertility: A rare case report. **Journal of South Asian Federation of Obstetrics and Gynaecology**, v. 3, n. 3, p. 155–156, 2011.

CHOUSSEIN, S. et al. Mullerian dysgenesis: a critical review of the literature. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 295, n. 6, p. 1369–1381, 2017.

CHRISTENSEN, M. et al. Xanthurenic aciduria due to a mutation in KYNU encoding kynureninase. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 30, n. 2, p. 248–255, 2007.

CHU, C. et al. Variants in genes related to development of the urinary system are associated with Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome. **Human Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2022.

COOLS, M. et al. Caring for individuals with a difference of sex development (DSD): A Consensus Statement. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 7, p. 415–429, 2018.

CORSTEN-JANSSEN, N. et al. The cardiac phenotype in patients with a CHD7 mutation. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 6, n. 3, p. 248–254, 2013.

COSTANTINI, F.; SHAKYA, R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. **BioEssays**, v. 28, n. 2, p. 117–127, 2006.

COUTO, D.; MARQUES, I.; ÁGUAS, F. MURCS association in the context of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome – a case report. **Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa**. v. 1, n. 2, p. 91–94, 2007.

CRAMER, D. W. et al. Vaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome) associated with the N314D mutation of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT). **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 145–148, 1996.

CUNHA, G. C. R. **Avaliação genética em mulheres diagnosticadas clinicamente com Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser**. 2018. 89 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)- Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

DAVEY, R. A.; GROSSMANN, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 37, n. 1, p. 3–15, 2016.

DAVIS, R. J. et al. Mouse Dach1 and Dach2 are redundantly required for Müllerian duct development. **Genesis**, v. 46, n. 4, p. 205–213, 2008.

DE TOMASI, L. et al. Mutations in GREB1L Cause Bilateral Kidney Agenesis in Humans and Mice. **American Journal of Human Genetics**, v. 101, n. 5, p. 803–814, 2017.

DEEB, A. et al. Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 63, n. 1, p. 56–62, 2005.

DELIGEOROGLOU, E. et al. Management of hematocolpos in adolescents with transverse vaginal septum. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 285, n. 4, p. 1083–1087, 2012.

DÉMURGER, F. et al. New insights into genotype-phenotype correlation for GLI3 mutations. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 1, p. 92–102, 2015.

DIETRICH, J. E. The female reproductive tract: Congenital concerns. **Hormone and Metabolic Research**, v. 47, n. 5, p. 329–334, 2015.

DIETRICH, J. E.; MILLAR, D. M.; QUINT, E. H. Obstructive Reproductive Tract Anomalies. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 27, n. 6, p. 396–402, 2014a.

DIETRICH, J. E.; MILLAR, D. M.; QUINT, E. H. Non-Obstructive Müllerian Anomalies. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 27, n. 6, p. 386–395, 2014b.

DIJK, D. R.; BOCCA, G.; RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M. VAN. Growth in CHARGE syndrome: Optimizing care with a multidisciplinary approach. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**, v. 12, p. 607–620, 2019.

DIXIT, A. et al. 7q11.23 Microduplication: A recognizable phenotype. **Clinical Genetics**, v. 83, n. 2, p. 155–161, 2013.

DOSS, C. G. P. et al. In silico profiling and structural insights of missense mutations in RET protein kinase domain by molecular dynamics and docking approach. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 3, p. 421–436, 2014.

DRUMMOND, J. B. **Estudo dos genes WNT4 e CTNNB1 na Síndrome De Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser**. 2007. 82 f., il. Dissertação (Mestrado)—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

DU, H.; TAYLOR, H. S. The Role of Hox Genes in Female Reproductive tract development, adult function, and fertility. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

EDMONDS, D. K. Management of vaginal agenesis. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 25, n. 5, p. 382–387, 2013.

EDMONDS, D. K.; ROSE, G. L. Outflow tract disorders of the female genital tract. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 15, n. 1, p. 11–17, 2013.

EGGERMANN, T. et al. Search for altered imprinting marks in Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser patients. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1225–1228, 2018.

EGGERS, S.; SINCLAIR, A. Mammalian sex determination-insights from humans and mice. **Chromosome Research**, v. 20, n. 1, p. 215–238, 2012.

EHMKE, N. et al. Biallelic variants in KYNU cause a multisystemic syndrome with hand hyperphalangism. **Bone**, v. 133, 2020.

EKICI, A. B. et al. HOXA10 and HOXA13 sequence variations in human female genital malformations including congenital absence of the uterus and vagina. **Gene**, v. 518, n. 2, p. 267–272, 2013.

EKSI, D. et al. Copy number variation and regions of homozygosity analysis in patients with Müllerian aplasia. **Molecular Cytogenetics**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2018.

FIASCHETTI, V. et al. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome diagnosed by magnetic resonance imaging. Role of imaging to identify and evaluate the uncommon variation in development of the female genital tract. **Journal of Radiology Case Reports**, v. 6, n. 4, p. 17–24, 2012.

FLÜCK, C. E. et al. Broad Phenotypes of Disorders/Differences of Sex Development in MAMLD1 Patients Through Oligogenic Disease. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. 746, p. 1-17, 2019.

FOLCH, M.; PIGEM, I.; KONJE, J. C. Müllerian Agenesis: Etiology, Diagnosis and Management. **Obstetrical gynecological survey**, v. 55, n. 10, p. 644–649, 2000.

FONTANA, L. et al. Genetics of Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser (MRKH) syndrome. **Clinical Genetics**, v. 91, n. 2, p. 233–246, 2017.

FRANK, R. T. The formation of an artificial vagina without operation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 35, n. 6, p. 1053–1055, 1938.

FUKAMI, M. et al. Mastermind-like domain-containing 1 (MAMLD1 or CXorf6) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 9, p. 5525–5532, 2008.

GALANI, A. et al. Androgen insensitivity syndrome: Clinical features and molecular defects. **Hormones**, v. 7, n. 3, p. 217–229, 2008.

GERVASINI, C. et al. SHOX duplications found in some cases with type I Mayer-Rokitansky-Kuster- Hauser syndrome. **Genetics in Medicine**, v. 12, n. 10, p. 634–640, 2010.

GHAFFARI, M. et al. Genotype–phenotype correlation and the size of microdeletion or microduplication of 7q11.23 region in patients with Williams-Beuren syndrome. **Annals of Human Genetics**, v. 82, n. 6, p. 469–476, 2018.

GOH, G.; CHOI, M. Application of Whole Exome Sequencing to Identify Disease-Causing Variants in Inherited Human Diseases. **Genomics & Informatics**, v. 10, n. 4, p. 214, 2012.

GRIMBIZIS, G. F.; CAMPO, R. Congenital malformations of the female genital tract: the need for a new classification system. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 2, p. 401–407, 2010.

GUERRIER, D. et al. The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (congenital absence of uterus and vagina) - Phenotypic manifestations and genetic approaches. **Journal of Negative Results in BioMedicine**, v. 5, p. 1–8, 2006.

GULÍA, C. et al. Androgen Insensitivity Syndrome. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 12, p. 3873–3887, 2018.

GUNES, S. O.; MAHMUTOGLU, A. M.; AGARWAL, A. Genetic and epigenetic effects in sex determination. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 108, n. 4, p. 321–336, 2016.

GUO, Y. et al. Comparative Study of Exome Copy Number Variation Estimation Tools Using Array Comparative Genomic Hybridization as Control. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

HALE, C. L. et al. Atypical phenotypes associated with pathogenic CHD7 variants and a proposal for broadening CHARGE syndrome clinical diagnostic criteria. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 170A, n. 2, p. 344–354, 2016.

HALL, B. D. Choanal atresia and associated multiple anomalies. **The Journal of Pediatrics**, v. 95, n. 3, p. 395–398, 1979.

HAMILTON, K. J. et al. Estrogen Hormone Biology. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 125, p. 109–146, 2017.

HAMILTON, K. J.; ARAO, Y.; KORACH, K. S. Estrogen hormone physiology: Reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. **Reprod Biol**, v. 14, n. 1, p. 3–8, 2014.

HARAGUCHI, R. et al. Unique functions of sonic hedgehog signaling during external genitalia development. **Development**, v. 128, n. 21, p. 4241–4250, 2001.

HARAGUCHI, R. et al. Molecular analysis of coordinated bladder and urogenital organ formation by Hedgehog signaling. **Development**, v. 134, n. 3, p. 525–533, 2007.

HEFNER, M. A.; FASSI, E. Genetic counseling in CHARGE syndrome: Diagnostic evaluation through follow up. **American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 175, n. 4, p. 407–416, 2017.

HELLER-BOERSMA, J. G.; EDMONDS, D. K.; SCHMIDT, U. H. A cognitive behavioural model and therapy for utero-vaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome: MRKH). **Behavioural and Cognitive Psychotherapy**, v. 37, n. 4, p. 449–467, 2009.

HERLIN, M.; HØJLAND, A. T.; PETERSEN, M. B. Familial occurrence of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: A case report and review of the literature. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 164, n. 9, p. 2276–2286, 2014.

HERLIN, M. K. et al. Whole-exome sequencing identifies a GREB1L variant in a three-generation family with Müllerian and renal agenesis: A novel candidate gene in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. A case report. **Human Reproduction**, v. 34, n. 9, p. 1838–1846, 2019.

HERLIN, M. K. Genetics of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome: advancements and implications. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, n. April, p. 1–13, 2024.

HERLIN, M. K.; PETERSEN, M. B.; BRÄNNSTRÖM, M. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome: a comprehensive update. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2020.

HSU, P. et al. CHARGE syndrome: A review. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 50, n. 7, p. 504–511, 2014.

HUDSON, A.; TRIDER, C.-L.; BLAKE, K. CHARGE syndrome. **Pediatrics in Review**, v. 38, n. 1, p. 56–59, 2017.

HUGHES, I. A. et al. Androgen insensitivity syndrome. **The Lancet**, v. 380, n. 9851, p. 1419–1428, 2012.

ILLUMINA, INC. An introduction to next-generation sequencing technology. p. 1–16, 2017.

INGRAM, J. M. The bicycle seat stool in the treatment of vaginal agenesis and stenosis: A preliminary report. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 140, n. 8, p. 867–873, 1981.

JÄÄSKELÄINEN, J. Molecular biology of androgen insensitivity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 352, n. 1–2, p. 4–12, 2012.

JACQUINET, A. et al. GREB1L variants in familial and sporadic hereditary urogenital adysplasia and Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. **Clinical Genetics**, v. 98, n. 2, p. 126–137, 2020.

JEANPIERRE, C. et al. RET and GDNF mutations are rare in fetuses with renal agenesis or other severe kidney development defects. **Journal of Medical Genetics**, v. 48, n. 7, p. 497–504, 2011.

JIA, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, J. Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 557–568, 2015.

JOHNSTON, J. J. et al. Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and pallister-hall syndromes: Robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. **American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 4, p. 609–622, 2005.

JOLLY, A. et al. Rare variant enrichment analysis supports GREB1L as a contributory driver gene in the etiology of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Human Genetics and Genomics Advances**, v. 4, n. 3, 2023.

JORDAN, V. K.; ZAVERI, H. P.; SCOTT, D. A. 1p36 deletion syndrome: An update. **Application of Clinical Genetics**, v. 8, p. 189–200, 2015.

KALFA, N. et al. Polymorphisms of MAMLD1 gene in hypospadias. **Journal of Pediatric Urology**, v. 7, n. 6, p. 585–591, 2011.

KAMAL, E. M.; LAKHDAR, A.; BAIDADA, A. Management of a transverse vaginal septum complicated with hematocolpos in an adolescent girl: Case report. **International Journal of Surgery Case Reports**, v. 77, p. 748–752, 2020.

KANG, J. et al. Congenital anal atresia with rectovestibular fistula, scoliosis, unilateral renal agenesis, and finger defect (VACTERL association) in a patient with partial bicornuate uterus and distal vaginal atresia. **Medicine**, v. 97, n. 45, p. 1–4, 2018.

KAPCZUK, K.; KĘDZIA, W. Primary amenorrhea due to anatomical abnormalities of the reproductive tract: Molecular insight. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, 2021.

KAWAI, K.; TAKAHASHI, M. Intracellular RET signaling pathways activated by GDNF. **Cell and Tissue Research**, v. 382, n. 1, p. 113–123, 2020.

KELLER, J. L.; KACKER, A. Choanal atresia, charge association, and congenital nasal stenosis. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 33, n. 6, p. 1343–1351, 2000.

KENEALY, M. R. et al. The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor  $\alpha$  gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. **Endocrinology**, v. 141, n. 8, p. 2805–2813, 2000.

KLATTIG, J. et al. WT1-mediated gene regulation in early urogenital ridge development. **Sexual Development**, v. 1, n. 4, p. 238–254, 2007.

KLEIN, M. T. et al. Toward selective drug development for the human 5-hydroxytryptamine 1E receptor: a comparison of 5-hydroxytryptamine 1E and 1F receptor structure-affinity relationships. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 337, n. 3, p. 860–7, 2011.

KLIPSTEIN, S. et al. The N314D polymorphism of the GALT gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 171–174, 2003.

KNOWLES, P. P. et al. Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33577–33587, 2006.

KOBAYASHI, A. et al. Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. **Development**, v. 131, n. 3, p. 539–549, 2004.

KOLVENBACH, C. M. et al. Exome survey of individuals affected by VATER/VACTERL with renal phenotypes identifies phenocopies and novel candidate genes. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 185, n. 12, p. 3784–3792, 2021.

KOMURA, M. et al. A female infant who had both complete VACTERL association and MURCS association: Report of a case. **Surgery Today**, v. 37, n. 10, p. 878–880, 2007.

KOTHANDAPANI, A. et al. GLI3 resides at the intersection of hedgehog and androgen action to promote male sex differentiation. **PLoS Genetics**, v. 16, n. 6, p. 1–23, 2020.

KOTULAK-CHRZAŚCZ, A.; KMIEĆ, Z.; WIERZBICKI, P. M. Sonic Hedgehog signaling pathway in gynecological and genitourinary cancer (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 6, p. 1–20, 2021.

KOUVARAKI, M. A. et al. RET proto-oncogene: A review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. **Thyroid**, v. 15, n. 6, p. 531–544, 2005.

KOZEL, B. A. et al. Williams syndrome. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2021.

KYEI BARFFOUR, I.; KWARKOH, R. K. B. GREB1L as a candidate gene of Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser Syndrome. **European Journal of Medical Genetics**, v. 64, n. 3, p. 104158, 2021.

KYEI-BARFFOUR, I. et al. The embryological landscape of mayer-rokitansky-kuster-hauser syndrome: Genetics and environmental factors. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 94, n. 4, p. 657–672, 2021.

LANCIOTTI, L. et al. Different clinical presentations and management in complete androgen insensitivity syndrome (CAIS). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 7, p. 1–20, 2019.

LANKFORD, J. C.; MANCUSO, P.; APPEL, R. Congenital reproductive abnormalities. **Journal of Midwifery and Women's Health**, v. 58, n. 5, p. 546–551, 2013.

LAUFER, M. R. Congenital absence of the vagina: In search of the perfect solution. When, and by what technique, should a vagina be created? **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 14, n. 5, p. 441–444, 2002.

LAYMAN, L. C. The genetics of Mullerian aplasia. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 411–419, 2014.

LEDIG, S. et al. Array-comparative genomic hybridization analysis in patients with Müllerian fusion anomalies. **Clinical Genetics**, v. 93, n. 3, p. 640–646, 2018.

LEDIG, S. et al. Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 5, p. 1589–1594, 2011.

LEDIG, S. et al. Frame shift mutation of LHX1 is associated with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. **Human Reproduction**, v. 27, n. 9, p. 2872–2875, 2012.

LEDIG, S.; WIEACKER, P. Clinical and genetic aspects of Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome. **Medizinische Genetik**, v. 30, n. 1, p. 3–11, 2018.

LEE, P. A. et al. Consensus Statement on Management of Intersex Disorders. International consensus conference on intersex. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. e488–e500, 2006.

LEE, X. Y. et al. Structural mechanism underlying variations in DNA binding by the androgen receptor. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 241, n. January, p. 106499, 2024.

LÉGARÉ, S. et al. The estrogen receptor cofactor SPEN functions as a tumor suppressor and candidate biomarker of drug responsiveness in hormone-dependent breast cancers. **Cancer Research**, v. 75, n. 20, p. 4351–4363, 2015.

LERMANN, J. et al. Comparison of different diagnostic procedures for the staging of malformations associated with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 1, p. 156–159, 2011.

LI, J.; AL-AZZAWI, F. Mechanism of androgen receptor action. **Maturitas**, v. 63, n. 2, p. 142–148, 2009.

LI, L. et al. Clinical and molecular spectrum of 46,XY disorders of sex development that harbour MAMLD1 variations: Case series and review of literature. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2020.

LI, Y. Modern epigenetics methods in biological research. **Methods**, v. 187, p. 104–113, 2021.

LIN, X. et al. ADAMTS18 regulates vaginal opening through influencing the fusion of Mullerian duct and apoptosis of vaginal epithelial cells in mice. **Reproductive Biology**, v. 21, n. 3, p. 100537, 2021.

LINDNER, T. H. et al. A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$ . **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 11, 1999.

LINKE, F. et al. Right esophageal lung in a preterm child with VACTERL association and Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Pediatric Surgery International**, v. 21, n. 4, p. 285–288, 2005.

LISZEWSKA-KAPLON, M. et al. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome as an interdisciplinary problem. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 29, n. 4, p. 505–511, 2020.

LIU, J. et al. HOXA1 gene is not potentially related to ventricular septal defect in chinese children. **Pediatric Cardiology**, v. 34, n. 2, p. 226–230, 2013.

LIU, X. et al. Drug resistance profiles of mutations in the RET kinase domain. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 17, p. 3504–3515, 2018.

LONDRA, L.; CHUONG, F. S.; KOLP, L. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a review. **International Journal of Women's Health**, v. 7, p. 865–870, 2015.

MAKIYAN, Z. Studies of gonadal sex differentiation. **Organogenesis**, v. 12, n. 1, p. 42–51, 2016.

MAKKI, N.; CAPECCHI, M. R. Identification of novel Hoxa1 downstream targets regulating hindbrain, neural crest and inner ear development. **Developmental Biology**, v. 357, n. 2, p. 295–304, 2011.

MANNAERTS, D. et al. A rare cause of primary amenorrhoea, the XY female with gonadal dysgenesis. **BMJ Case Reports**, v. 2015, p. 2014–2016, 2015.

MARCHUK, D. S. et al. Increasing the diagnostic yield of exome sequencing by copy number variant analysis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–14, 2018.

MARK, P. R. NAD<sup>+</sup> deficiency in human congenital malformations and miscarriage: A new model of pleiotropy. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 188, n. 9, p. 2834–2849, 2022.

MAROZZI, A. et al. Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected by premature ovarian failure. **Human Genetics**, v. 107, n. 4, p. 304–311, 2000.

MATISSEK, S. J.; ELSAWA, S. F. GLI3: A mediator of genetic diseases, development and cancer. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 1–20, 2020.

MCALLISTER, G. et al. Molecular Cloning of a Serotonin Receptor from Human Brain (5HT1E) - A 5th 5HT1-Like Subtype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. June, p. 5517–5521, 1992.

MEHTA, P.A, EBENS C. Fanconi Anemia. 2002 Feb 14 [Atualizado 2021 Jun 3]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/>>

MENDELSON, C. et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. **Development**, v. 120, n. 10, p. 2749-2771, 1994.

MENDOZA, N.; MOTOS, M. A. Androgen insensitivity syndrome. **Gynecological Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 1–5, 2013.

MENG, H. et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 5, p. 604–617, 2015.

MIKHAEL, S. et al. Genetics of agenesis/hypoplasia of the uterus and vagina: narrowing down the number of candidate genes for Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser Syndrome. **Human Genetics**, v. 140, n. 4, p. 667–680, 2021.

MILSOM, S. R. et al. Discordant Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome in identical twins—a case report and implications for reproduction in MRKH women. **Gynecological Endocrinology**, v. 31, n. 9, p. 684–687, 2015.

MIYADO, M.; FUKAMI, M.; OGATA, T. MAMLD1 and Differences/Disorders of Sex Development: An Update. **Sexual Development**, v. 16, n. 2–3, p. 126–137, 2022.

MIYAMOTO, Y. et al. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 1–18, 2008.

MO, R. et al. Anorectal malformations caused by defects in sonic hedgehog signaling. **American Journal of Pathology**, v. 159, n. 2, p. 765–774, 2001.

MOEN, M. H. Vaginal agenesis treated by coital dilatation in 20 patients. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 125, n. 3, p. 282–283, 2014.

MONGAN, N. P. et al. **Androgen insensitivity syndrome. Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 569–580, 2015.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 5a Edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MORCEL, K. et al. Involvement of ITIH5, a candidate gene for congenital uterovaginal aplasia (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome), in female genital tract development. **Gene Expression**, v. 15, n. 5–6, p. 207–214, 2013.

MORCEL, K. et al. Le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) : clinique et génétique. **Journal de Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction**, v. 37, n. 6, p. 539–546, 2008.

MORCEL, K. et al. Utero-vaginal aplasia (Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome) associated with deletions in known DiGeorge or DiGeorge-like loci. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 6, n. 1, p. 9, 2011.

MORCEL, K.; CAMBORIEUX, L.; GUERRIER, D. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2007.

MORRIS, C. A. et al. 7q11.23 Duplication syndrome: Physical characteristics and natural history. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 167, n. 12, p. 2916–2935, 2015.

MORTLOCK, D. P.; INNIS, J. W. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. **Nature Genetics**, v. 15, n. 2, p. 179–80, 1997.

MUKHERJEE, S. et al. Identifying digenic disease genes via machine learning in the Undiagnosed Diseases Network. **American Journal of Human Genetics**, v. 108, n. 10, p. 1946–1963, 2021.

MURAKUMO, Y. et al. RET and neuroendocrine tumors. **Pituitary**, v. 9, n. 3, p. 179–192, 2006.

NAKHAL, R. S.; CREIGHTON, S. M. Management of Vaginal Agenesis. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 25, n. 6, p. 352–357, 2012.

NARUMI, Y. et al. Genital abnormalities in Pallister-Hall syndrome: Report of two patients and review of the literature. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 152 A, n. 12, p. 3143–3147, 2010.

NG, K. et al. Treatment of patients with mayer-rokitanskyküster-hauser syndrome in a tertiary hospital. **Hong Kong Medical Journal**, v. 26, n. 5, p. 397–403, 2020.

NIK-ZAINAL, S. et al. High incidence of recurrent copy number variants in patients with isolated and syndromic Müllerian aplasia. **Journal of Medical Genetics**, v. 48, n. 3, p. 197–204, 2011.

NURK, S. et al. The complete sequence of a human genome. **Science**, v. 376, n. 6588, p. 44–53, abr. 2022.

OHNESORG, T.; VILAIN, E.; SINCLAIR, A. H. The genetics of disorders of sex development in humans. **Sexual Development**, v. 8, n. 5, p. 762–772, 2014.

ONO, M.; HARLEY, V. R. Disorders of sex development: New genes, new concepts. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 2, p. 79–91, 2013.

OPPELT, P. et al. DNA sequence variations of the entire anti-Müllerian hormone (AMH) gene promoter and AMH protein expression in patients with the Mayer-Rokitanski-Küster-Hauser syndrome. **Human Reproduction**, v. 20, n. 1, p. 149–157, 2005.

OPPELT, P. et al. Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser syndrome: Recommendations for clinical diagnosis and staging. **Human Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 792–797, 2006.

PAN, H. XIN et al. Detection of de novo genetic variants in Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome by whole genome sequencing. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology: X**, v. 4, p. 1–6, 2019.

PARROTT, A. et al. Aortopathy in the 7q11.23 microduplication syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 167, n. 2, p. 363–370, 2015.

PASSOS, I. DE M. P. E.; BRITTO, R. L. Diagnosis and treatment of müllerian malformations. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 59, n. 2, p. 183–188, 2020.

PATIL, S. J. et al. Familial 7q11.23 duplication with variable phenotype. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 167, n. 11, p. 2727–2730, 2015.

PATNAIK, S. S. et al. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome: A historical perspective. **Gene**, v. 555, n. 1, p. 33–40, 2015.

PEREIRA, P. C. B. et al. Whole-exome sequencing as a diagnostic tool for distal renal tubular acidosis. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 6, p. 583–589, 2015.

PHILIBERT, P. et al. Identification and functional analysis of a new WNT4 gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and Müllerian duct abnormalities: A French collaborative study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 3, p. 895–900, 2008.

PIAZZA, M. J.; URBANETZ, A. A.; CARVALHO, N. S. Malformações genitais e erros genéticos. **Femina**, v. 39, n. 1, p. 13–18, 2011.

PIFERRER, F. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 4, p. 360–370, 2013.

PITOT, M. A.; BOOKWALTER, C. A.; DUDIACK, K. M. Müllerian duct anomalies coincident with endometriosis: a review. **Abdominal Radiology**, v. 45, n. 6, p. 1723–1740, 2020.

PIZZO, A. et al. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome: Embryology, Genetics and Clinical and Surgical Treatment. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

PLAÇA, J. R. **Avaliação do perfil genômico dos genes da família HOX em tumores a partir de bancos públicos**. 2017. 84 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências)—Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

PLAZA-MENACHO, I. Structure and function of RET in multiple endocrine neoplasia type 2. **Endocrine-Related Cancer**, v. 25, n. 2, p. T79–T90, 2018.

PLUTA, D. et al. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome – case studies, methods of treatment and the future prospects of human uterus transplantation. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 549–563, 2020.

PONTECORVI, P. et al. Protein–protein interaction network analysis applied to DNA copy number profiling suggests new perspectives on the aetiology of Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

POZZOBON, A. **Modulação androgênica da proliferação celular: expressão do receptor de androgênios, co-reguladores e genes-alvo em células epiteliais prostáticas humanas**. 2006. 139 f., il. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

QIN, X. et al. Serotonin/HTR1E signaling blocks chronic stresspromoted progression of ovarian cancer. **Theranostics**, v. 11, n. 14, p. 6950–6965, 2021.

QUAYNOR, S. D. et al. Delayed Puberty and Estrogen Resistance in a Woman with Estrogen Receptor  $\alpha$  Variant. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 2, p. 164–71, 2013.

QUINT, E. H.; MCCARTHY, J. D.; SMITH, Y. R. Vaginal surgery for congenital anomalies. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 53, n. 1, p. 115–124, 2010.

RADIO, F. C. et al. SPEN haploinsufficiency causes a neurodevelopmental disorder overlapping proximal 1p36 deletion syndrome with an epistatue of X chromosomes in females. **American Journal of Human Genetics**, v. 108, n. 3, p. 502–516, 2021.

RAGAN, D. C. et al. Genitourinary anomalies in the charge association. *Journal of Urology*, v. 161, n. 2, p. 622–625, 1999.

RAGITHA, T. S. et al. Mutation analysis of WNT4 gene in SRY negative 46,XX DSD patients with Mullerian agenesis and/or gonadal dysgenesis- An Indian study. *Gene*, v. 861, n. January, p. 26–29, 2023.

RALL, K. et al. A combination of transcriptome and methylation analyses reveals embryologically relevant candidate genes in MRKH patients. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 6, n. 1, p. 32, 2011.

RALL, K. et al. Typical and Atypical Associated Findings in a Group of 346 Patients with Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser Syndrome. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 28, n. 5, p. 362–368, 2015.

RATAN, S. K. et al. Polymorphism of 3' UTR of MAMLD1 gene is also associated with increased risk of isolated hypospadias in Indian children: a preliminary report. **Pediatric Surgery International**, v. 32, n. 5, p. 515–524, 2016.

RAVEL, C. et al. Polymorphisms in DLGH1 and LAMC1 in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 24, n. 4, p. 462–465, 2012.

RETTNER, K. et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. **Genetics in Medicine**, v. 18, n. 7, p. 696–704, 2016.

REYNAERT, N. et al. Expanding the CHARGE Geno-Phenotype: A Girl with Novel CHD7 Deletion, Hypogonadotropic Hypogonadism, and Agenesis of Uterus and Ovaries. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 85, n. 4, p. 288–290, 2016.

RICHARDS, S. et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**. v. 17, n. 5, p. 405–424, 2015.

ROBERT-FINESTRA, T. et al. SPEN is required for Xist upregulation during initiation of X chromosome inactivation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2021.

RODRIGUEZ, I. et al. Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. **Developmental Biology**, v. 184, n. 1, p. 115–121, 1997.

ROSKOSKI, R.; SADEGHI-NEJAD, A. Role of RET protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment RET-driven thyroid and lung cancers. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 1–17, 2018.

ROTH, L. P. et al. Müllerian Agenesis in a patient with Rubinstein-Taybi Syndrome: A Case Series and Review of the Overlapping Developmental Biologic Pathways. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 37, n. 1, p. 67–71, 2024.

ROUSSET, P. et al. Ultrasonography and MRI features of the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Clinical Radiology**, v. 68, n. 9, p. 945–952, 2013.

RUSIDZÉ, M. et al. Estrogen receptor- $\alpha$  signaling in post-natal mammary development and breast cancers. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 15, p. 5681–5705, 2021.

SADLER, T. W. Langman - **Embriologia Médica**. 13<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SAKAI, T. et al. Point mutation in exon 12 of the receptor tyrosine kinase proto-oncogene RET in Ondine-Hirschsprung syndrome. **Pediatrics**, v. 101, n. 5, p. 924–926, 1998.

SAMARAKOON, P. S. et al. Identification of copy number variants from exome sequence data. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2014.

SANDBACKA, M. et al. Methylation of H19 and its imprinted control region (H19 ICR1) in Müllerian aplasia. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 8, p. 2703–2706, 2011.

SANDBACKA, M. et al. TBX6, LHX1 and copy number variations in the complex genetics of Müllerian aplasia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2013.

SCHÜLE, I. et al. A homozygous deletion of exon 5 of KYNU resulting from a maternal chromosome 2 isodisomy (UPD2) causes Catel-Manzke-syndrome/VCRL syndrome. **Genes**, v. 12, n. 6, p. 1-13, 2021.

SETTIN, A. et al. Rapid sex determination using PCR technique compared to classic cytogenetics. **International journal of health sciences**, v. 2, n. 1, p. 49–52, 2008.

SHARMA, V. K. et al. Characterization of serotonin-5-HTR1E signaling pathways and its role in cell survival. **FASEB Journal: Oficial publication of the Federation of American Societies of Experimental Biology**, v. 37, n. 5, p. 1–28, 2023.

SHI, H. et al. NAD Deficiency, Congenital Malformations, and Niacin Supplementation. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 544–552, 2017.

SHIMAMURA, A.; ALTER, B. P. Pathophysiology and Management of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. **Blood Reviews**, v. 24, n. 3, p. 101–122, 2010.

SHY, H. M. **Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome**. 2016 55 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciência)- Universidade do Arizona, 2016.

SINGH, S. et al. A rare case of low transverse vaginal septum. **International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology**, v. 4, n. 6, p. 3003–3006, 2015.

SKINNER, M. A. et al. Renal Aplasia in Humans Is Associated with RET Mutations. **American Journal of Human Genetics**, v. 82, n. 2, p. 344–351, 2008.

SMOL, T. et al. Mayer-Rokitansky-Künster-Hauser syndrome due to 2q12.1q14.1 deletion: PAX8 the causing gene? **European Journal of Medical Genetics**, v. 63, n. 4, p. 103812, 2020.

SOMERVILLE, M. J. et al. Severe Expressive-Language Delay Related to Duplication of the Williams–Beuren Locus. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1694–1701, 2005.

SOUSA, S. et al. Management of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. **Acta obstetrica e ginecologica portuguesa**, v. 8, n. 1, p. 8–13, 2014.

STEINKAMPF, M. P.; DHARIA, S. P.; DICKERSON, R. D. Monozygotic twins discordant for vaginal agenesis and bilateral tibial longitudinal deficiency. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 3, p. 643–645, 2003.

STUPPIA, L. et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3245–3276, 2012.

SUBRAMANIAM, A. et al. Androgen insensitivity syndrome: ten years of our experience. **Frontier in bioscience**, n. 4, p. 779–784, 2013.

SUGIMOTO, K. et al. Heterozygous p.S811F RET gene mutation associated with renal agenesis, oligomeganephronia and total colonic aganglionosis: a case report. **BMC Nephrology**, v. 17, n. 1, p. 1–5, 2016.

SULTAN, C.; BIASON-LAUBER, A.; PHILIBERT, P. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: Recent clinical and genetic findings. **Gynecological Endocrinology**, v. 25, n. 1, p. 8–11, 2009.

SZOT, J. O. et al. New cases that expand the genotypic and phenotypic spectrum of Congenital NAD Deficiency Disorder. **Human Mutation**, v. 42, n. 7, p. 862–876, 2021.

TADOKORO-CUCCARO, R.; HUGHES, I. A. Androgen insensitivity syndrome. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 21, n. 6, p. 499–503, 2014.

TAKAHASHI, K. et al. Exome and copy number variation analyses of Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome. **Human Genome Variation**, v. 5, n. 1, p. 0–4, 2018.

TAKAHASHI, M. RET receptor signaling: Function in development, metabolic disease, and cancer. **Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences**, v. 98, n. 3, p. 112–125, 2022.

TAN, M. E. et al. Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 3–23, 2015.

TAN, R.; SHEN, Y. Accurate in silico confirmation of rare copy number variant calls from exome sequencing data using transfer learning. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 21, p. E123, 2022.

TANITAME, K. et al. Congenital anomalies causing hemato/hydrocolpos: imaging findings, treatments, and outcomes. **Japanese Journal of Radiology**, v. 39, n. 8, p. 733–740, 2021.

TEWES, A. C. et al. Variations in RBM8A and TBX6 are associated with disorders of the müllerian ducts. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 5, p. 1313–1318, 2015.

TEWES, A. C. et al. Sequence Variants in TBX6 Are Associated with Disorders of the Müllerian Ducts: An Update. **Sexual Development**, v. 13, n. 1, p. 35–40, 2019.

THOMSON, E. et al. Functional genomics analysis identifies loss of HNF1B function as a cause of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Human molecular genetics**, v. 32, n. 6, p. 1032–1047, 2023.

TIMMRECK, L. S. et al. Analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in patients with congenital absence of the uterus and vagina. **American Journal of Medical Genetics**, v. 120A, n. 1, p. 72–76, 2003.

TORRES-CANO, A. et al. Deletion of Wt1 during early gonadogenesis leads to differences of sex development in male and female adult mice. **PLoS Genetics**, v. 18, n. 6, p. 1–23, 2022.

TOUZON, M. S. et al. Androgen insensitivity syndrome: Clinical phenotype and molecular analysis in a single tertiary center cohort. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 24–33, 2019.

TRIANAFYLLIDI, V. E. et al. Identification of Genetic Causes in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) Syndrome: A Systematic Review of the Literature. **Advances in Neonatal Care**, v. 9, n. 7, p. 961, 2022.

TRIDER, C. L. et al. Developing a CHARGE syndrome checklist: Health supervision across the lifespan (from head to toe). **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 173, n. 3, p. 684–691, 2017.

TUCCI, V. et al. Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. **Cell**, v. 176, n. 5, p. 952–965, 2019.

VAN DE PUTTE, R. et al. Spectrum of congenital anomalies among VACTERL cases: a EUROCAT population-based study. **Pediatric Research**, v. 87, n. 3, p. 541–549, 2019.

VAN DE PUTTE, R. et al. A Genetics-First Approach Revealed Monogenic Disorders in Patients With ARM and VACTERL Anomalies. **Frontiers in Pediatrics**, v. 8, n. June, p. 1–10, 2020.

VERLOES, A. Updated diagnostic criteria for CHARGE syndrome: A proposal. **American Journal of Medical Genetics**, v. 133 A, n. 3, p. 306–308, 2005.

VISSERS, L. E. L. M. et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. **Nature Genetics**, v. 36, n. 9, p. 955–957, 2004.

WALIA, R. et al. Disorders of sex development: A study of 194 cases. **Endocrine Connections**, v. 7, n. 2, p. 364–371, 2018.

WANG, L. et al. Role of HOXA1-4 in the development of genetic and malignant diseases. **Biomarker Research**, v. 12, n. 1, p. 1–23, 2024.

WANG, T. et al. Large-scale targeted sequencing identifies risk genes for neurodevelopmental disorders. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.

WANG, Y. et al. A novel variant of GLI3, p.Asp1514Thrfs\*5, is identified in a Chinese family affected by polydactyly. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 10, n. 7, p. 1–8, 2022.

WATANABE, K. et al. Recent advances in the molecular mechanisms of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (Review). **Biomedical Reports**, v. 7, n. 2, p. 123–127, 2017.

WILLIAMS, L. S. et al. A balanced chromosomal translocation involving chromosomes 3 and 16 in a patient with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome reveals new candidate genes at 3p22.3 and 16p13.3. **Molecular Cytogenetics**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2016.

WILLIAMS, L. S. et al. Genetic analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in a large cohort of families. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 1, p. 145- 151.e2, 2017.

WOOD, O. R.; ELSE, T.; SAMPSON, M. G. Unique association of multiple endocrine neoplasia 2A and congenital anomalies of the kidney and urinary tract in a child with a RET mutation. **BMJ Case Reports**, v. 12, n. 8, p. 10–12, 2019.

WORTMANN, S. B. et al. How to proceed after “negative” exome: A review on genetic diagnostics, limitations, challenges, and emerging new multiomics techniques. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 45, n. 4, p. 663–681, 2022.

WU, C. Q. et al. A Review of Mullerian Anomalies and Their Urologic Associations. **Urology**, v. 151, p. 98–106, 2021.

WU, H. et al. Identification of 8 Novel Mutations in Nephrogenesis-Related Genes in Chinese Han Patients with Unilateral Renal Agenesis. **American Journal of Nephrology**, v. 46, n. 1, p. 55–63, 2017.

XIE, C. et al. **BRCA2 gene mutation in cancer. Medicine (Baltimore)**, v. 101, n. 45, p. E31705, 2022.

YABE, D. et al. Generation of a conditional knockout allele for mammalian Spen protein Mint/SHARP. **Genesis**, v. 45, n. 5, p. 300–306, 2007.

YU, H. et al. Comparative analysis of the mammalian WNT4 promoter. **BMC Genomics**, v. 10, p. 416, 2009.

YUAN, S.-M. et al. Phenotypic and molecular characteristics of androgen insensitivity syndrome patients. **Asian Journal of Andrology**, v. 20, n. 5, p. 473–478, 2018.

ZARATE, Y. A. et al. Cardiovascular and genitourinary anomalies in patients with duplications within the Williams syndrome critical region: Phenotypic expansion and review of the literature. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 164, n. 8, p. 1998–2002, 2014.

ZHANG, W. et al. Identification and functional analysis of a novel LHX1 mutation associated with congenital absence of the uterus and vagina. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8785–8790, 2017.

ZHANG, Y. et al. A rare variant at the KYNU gene is associated with kynureninase activity and essential hypertension in the Han Chinese population. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 4, n. 6, p. 687–694, 2011.